

Anaerober Abbau von Alkanen und Alkenen durch Sulfatreduzierer



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps Universität Marburg
vorgelegt von

Katharina Sünwoldt

Diplom-Biologin

aus Neubrandenburg

Marburg/Lahn 2016

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom April 2012 bis Dezember 2015 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 25.08. 2016 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	7
ZUSAMMENFASSUNG	8
SUMMARY	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	12
EINLEITUNG	14
1. Bakterieller Abbau von Kohlenwasserstoffen	14
1.1 Aerober Abbau von Alkanen	14
2. Aerober Abbau von Alkenen	15
3. Anaerober Abbau von Alkanen	18
4. Anaerober Abbau von Alkenen	19
5. Ethylbenzaldehydrogenase	23
6. Ethylbenzaldehydrogenase ähnliche Enzyme	24
7. Sulfatreduzierer	25
ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN	27
MATERIAL UND METHODEN	28
1. Verwendete Organismen	28
2. Geräte.....	29
2.1 Elektrophorese	29
2.2 Spektralphotometer	29
2.3 Zellaufschluss.....	29
2.4 Zentrifugen	29
2.5 weitere Geräte.....	29
3. Enzyme.....	30
4. Oligonukleotide	30
4.1 Oligonukleotide für die Klonierung der Molybdopterininoxidoreduktasen.....	30
5. Vektoren	31
6. Chemikalien und Gase.....	32
7. Mikrobiologische Methoden	32
7.1 Kultivierung von <i>Desulfococcus oleovorans</i> und <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> ...	32
7.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	35

7.3 Kultivierung von <i>Pseudomonas stutzeri</i> Stamm K	37
7.4 Isolierung eines Streptomycin resistenten <i>Pseudomonas stutzeri</i> Stamm K	38
7.5 Anzucht von <i>Pseudomonas</i> im Fermenter	38
8. Molekularbiologische Methoden	39
8.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (Inoue et al., 1990)	39
8.2 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	40
8.3 Herstellung elektrokompeter <i>P. stutzeri</i> Zellen	40
8.4 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	41
8.5 Transformation von elektrokompeter Zellen	41
8.6 Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>	41
8.7 Isolierung genomischer DNA aus <i>D. oleovorans</i> und <i>D. alkenivorans</i>	42
8.8 Vervielfältigung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
8.9 Konzentrationsbestimmung von DNA	44
8.10 Auftrennung der DNA durch Agarosegelelektrophorese	44
8.11 Klassische Klonierung	45
8.12 Restriktionsverdau	45
8.13 Klonierung Alkanhydroxylase-Komplex aus <i>D. oleovorans</i>	46
8.14 Klonierung der Acetylenhydratase-ähnlichen Enzyme aus <i>Desulfococcus</i> <i>oleovorans</i>	47
8.15 Färbung von Biotinenzymen auf Western Blots	48
8.16 Bindung von Biotinenzymen an Streptavidin beads	50
9. Biochemische Methoden	51
9.1 Herstellung von Zellextrakt aus <i>D. oleovorans</i> und <i>D. alkenivorans</i>	51
9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	51
9.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE	52
9.4 Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel	53
9.5 Aufkonzentrierung von Proteinen	54
9.6 Reinigung der Alkoholdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i>	54
9.7 Bestimmung der Enzymaktivität der Alkoholdehydrogenase	55
9.8 Hämfärbung	56
9.9 Aktivitätsfärbung (ADH <i>Pseudomonas</i>)	57
9.10 Sulfidbestimmung	58
10. Analytische Methoden	59
10.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion	59
10.2 Extraktion und Analyse von Lipidfettsäuren	59
10.3 Identifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF)	60
ERGEBNISSE	62

1. Wachstum von <i>D. oleovorans</i> und <i>D. alkenivorans</i> auf verschiedenen Substraten	62
2. Induzierte Proteine	64
3. Analyse der Fettsäuremuster	66
3.1 Fettsäuremuster der Zellen bei Wachstum auf Reinsubstrat.....	66
3.2 Fettsäuremuster der Zellen bei Wachstum auf Mischsubstraten.....	69
4. GC/MS-Analyse von Zellextrakten	73
5. Überexpression des EBDH-ähnlichen Enzyms bzw. Klonierung des Alkanhydroxylase-Komplexes	75
6. Isolierung und Charakterisierung eines denitrifizierenden Bakteriums, das langkettige Isoalkohole abbaut	78
6.1 Identifizierung.....	80
7. Anaerober Alkenabbau in Sulfat reduzierenden Bakterien	87
7.1 Klonierung von MpoX Genen in einen <i>broad host range</i> Vektor	87
7.2 Wachstum von <i>D. oleovorans</i> und <i>D. alkenivorans</i> ohne Wolfram.....	93
DISKUSSION.....	94
1. Anaerober Alkanabbau durch <i>D. oleovorans</i>	94
2. Anaerober Abbau von Alkanen durch <i>D. alkenivorans</i> im Vergleich zu <i>D. oleovorans</i> ..	96
3. Alkanhydroxylase und Alkanhydroxylase-Komplex	97
4. Alternative iso-Alkoholdehydrogenase	100
5. Anaerober Alkenabbau durch Sulfatreduzierer.....	101
LITERATURVERZEICHNIS	105
ANHANG	111
DANKSAGUNG	125
LEBENS LAUF	126
ERKLÄRUNG	127

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Postulierter aerober Abbau von Ethen bzw. 1-Chlorethen durch <i>Xanthobacter</i> Stamm Py2.....	17
Abb. 2: Zusammenfassung der aeroben und anaeroben Abbauege von Alkanen und Alkenen.....	22
Abb. 3: Vektorkarte des <i>broad host range</i> Expressionsplasmids pASG-wt1-MOB.	48
Abb. 4: Wachstum von <i>Desulfococcus oleovorans</i> Stamm Hxd3 auf verschiedenen Substraten.....	62
Abb. 5: Wachstum von <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> Stamm AK-01 auf verschiedenen Substraten.....	63
Abb. 6: SDS-PAGE Analyse von <i>D. oleovorans</i> auf verschiedenen Substraten.....	64
Abb. 7: SDS-PAGE Analyse von <i>D. alkenivorans</i> auf verschiedenen Substraten.	66
Abb. 8: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in <i>D. oleovorans</i> auf verschiedenen Substraten.....	67
Abb. 9: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in <i>D. alkenivorans</i> auf verschiedenen Substraten.....	68
Abb. 10: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in <i>D. oleovorans</i> gewachsen auf Hexadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.....	69
Abb. 11: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in <i>D. oleovorans</i> gewachsen auf Heptadecan, 2-Hexadecanol und auf beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.....	70
Abb. 12: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in Zellen von <i>D. oleovorans</i> gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.....	71
Abb. 13: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in <i>D. alkenivorans</i> gewachsen auf Heptadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.....	72
Abb. 14: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in <i>D. alkenivorans</i> gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.....	72
Abb. 15: Massenspektrum von silyliertem 2-Hexadecanol.....	73
Abb. 16: Massenspektrum von silyliertem 2-Hexadecanol Standard 0,1 mM gelöst in n-Hexan.....	74
Abb. 17: Vergleich der GC/MS Chromatogramme der extrahierten Proben von <i>D. oleovorans</i> gewachsen auf Hexadecan (a) und Hexadecen (b).	75

Abb. 18: Vektorkarte des <i>E. coli</i> Expressionsplasmids pASG-IBA3 mit den klonierten Untereinheiten des Ethylbenzoldehydrogenase ähnlichen Enzyms.	76
Abb. 19: SDS-PAGE Analyse der Zellysate aus der Überexpression des Expressionsplasmids (pASG-IBA3 mit den Untereinheiten des EBDH ähnlichen Enzyms) in <i>E. coli</i> DH5α.	77
Abb. 20: Postulierter Alkanhydroxylase-Komplex mit den entsprechenden Genen.	77
Abb. 21: Phylogenetischer Stammbaum aus dem Vergleich der 16S-rDNA des selbstisolierten Stammes mit der Nukleotidsequenz anderer Bakterienstämme.	80
Abb. 22: Lichtmikroskopisches Bild von <i>Pseudomonas stutzeri</i> Stamm K auf 1-Hexadecanol.	81
Abb. 23: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in <i>P. stutzeri</i> Stamm K auf verschiedenen Substraten.	83
Abb. 24: SDS-PAGE und Nativ-PAGE von <i>P. stutzeri</i> Stamm K.	84
Abb. 25: An Streptavidin gebundene Proteine bzw. das gesamte Proteinmuster von <i>P. stutzeri</i> Stamm K gewachsen auf 2-Hexadecanol oder Hexadecanoat.	86
Abb. 26: Phylogenetischer Stammbaum von Acetylenhydratase-ähnlichen Enzymen aus vorwiegend anaeroben Alken abbauenden Bakterienstämmen.	89
Abb. 27: Vektorkarten des Expressionsplasmids pASG-wt1-MOB mit dem jeweiligen Acetylenhydratase-ähnlichen Gen aus <i>D. oleovorans</i>	91
Abb. 28: Postulierter Abbauweg von <i>D. oleovorans</i> Stamm Hxd3 bei anaerobem Wachstum auf Hexadecan.	95
Abb. 29: Postulierter Alkanhydroxylase-Komplex in <i>D. oleovorans</i>	100
Abb. 30: Postulierter anaerober Abbauweg von Alkenen durch Sulfatreduzierer.	102
Abb. 31: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in <i>D. oleovorans</i> gewachsen auf Hexadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.	120
Abb. 32: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in <i>D. oleovorans</i> gewachsen auf Heptadecan, 2-Hexadecanol und auf beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.	121
Abb. 33: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in Zellen von <i>D. oleovorans</i> gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.	122
Abb. 34: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in <i>D. alkenivorans</i> gewachsen auf Heptadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.	123

Abb. 35: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in <i>D. alkenivorans</i> gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen.....	124
--	-----

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bekannte Mikroorganismen, die Alkene als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können.....	20
Tab. 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.....	28
Tab. 3: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.....	32
Tab. 4: Mögliche identifizierte Enzyme der MALDI-TOF Analyse von Proteinen aus dem SDS-Gel von <i>D. oleovorans</i>	65
Tab. 5: Eigenschaften von <i>Pseudomonas stutzeri</i> Stamm K.....	81
Tab. 6: Spezifische Aktivitäten der Alkoholdehydrogenase aus <i>P. stutzeri</i> Stamm K in den entsprechenden Elutionsfraktionen der Enzymanreicherung mittels Anionenaustauschersäule (DEAE).....	84
Tab. 7: Spezifische Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus <i>P. stutzeri</i> Stamm K mit verschiedenen Substraten.....	85
Tab. 8: Bezeichnungen und Accession Nummer der in dieser Arbeit verwendeten Gene die für ein Acetylenhydratase-ähnliches Enzym codieren.....	90
Tab. 9: Wachstum von <i>P. stutzeri</i> Stamm K mit verschiedenen Vektoren unter anaeroben und aeroben Bedingungen, mit Hexadecen, 1-Hexadecanol oder Hexadecanoat als Substrat.	92
Tab. 10: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der α -Untereinheit der Alkanhydroxylase (Bande a der SDS-PAGE)	114
Tab. 11: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der β -Untereinheit der Alkanhydroxylase (Bande b der SDS-PAGE)	115
Tab. 12: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der γ -Untereinheit der Alkanhydroxylase (Bande c der SDS-PAGE).....	116
Tab. 13: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/ Peptide der Bande d der SDS-PAGE	116
Tab. 14: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/Peptide der Bande e der SDS-PAGE	117
Tab. 15: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der ATP-abhängigen Acyl-CoA Ligase (Bande f der SDS-PAGE)	118
Tab. 16: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/Peptide der Bande g der SDS-PAGE	118
Tab. 17: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/Peptide der Bande h der SDS-PAGE	119

Zusammenfassung

Alkane und Alkene kommen als Bestandteile von Erdöl häufig in der Natur vor. Aufgrund der globalen Verschmutzung durch Erdöl bzw. daraus resultierenden Kraftstoffen, spielt der Abbau dieser Verbindungen eine große Rolle. Diese Kohlenwasserstoffe können aerob mit Hilfe bakterieller Mono- oder Dioxygenasen abgebaut werden. Bei den meisten bekannten anaeroben Bakterien, die Alkane abbauen können, erfolgt der Angriff über eine Fumarat-Addition. Es gibt einige Mikroorganismen, die Alkene anaerob über einen alternativen Mechanismus abbauen, zu dem bisher keine genaueren Details bekannt sind. Im Fall der Alkene sprechen die bisherigen Erkenntnisse für eine Hydratisierung der Doppelbindung als mögliche initiale Reaktion. Zu den am besten untersuchten anaeroben Bakterien, die sowohl Alkane als auch Alkene abbauen können, zählen die Sulfatreduzierer *Desulfococcus oleovorans* Stamm Hxd3 und *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01. *D. alkenivorans* Stamm AK-01 baut Alkane über Fumarat-Addition ab, während *D. oleovorans* einen unbekannten alternativen Mechanismus für den Alkan-Abbau benutzt, allerdings auch Gene für ein Enzym enthält, das hohe Ähnlichkeit zur Ethylbenzaldehydrogenase (EBDH) aus *Aromatoleum aromaticum* aufweist.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den anaeroben Abbau von Alkanen und Alkenen durch diese Sulfatreduzierer näher zu charakterisieren und die mögliche Beteiligung des in *D. oleovorans* gefundenen EBDH-ähnlichen Enzyms am anaeroben Alkan- oder Alkenabbau zu untersuchen.

In *D. oleovorans* Zellen, die mit Hexadecan als Substrat wuchsen, wurden induzierte Proteine gefunden, die durch eine MALDI-TOF Analyse als Untereinheiten des EBDH-ähnlichen Enzyms identifiziert werden konnten. Dieses Enzym wurde in der vorliegenden Arbeit als Alkanhydroxylase bezeichnet, da es vermutlich für die Hydroxylierung des Alkans zum korrespondierenden iso-Alkohol verantwortlich ist. Das entsprechende Intermediat 2-Hexadecanol konnte tatsächlich auch in kleinen Mengen durch eine GC/MS Analyse einer zuvor extrahierten *D. oleovorans* Hexadecan-abbauenden Kultur nachgewiesen werden.

Der Untersuchung des anaeroben Alkenabbaus durch Sulfat reduzierende Bakterien wurde die Theorie zu Grunde gelegt, dass es sich bei der initialen Reaktion um eine Hydratisierung handeln könnte, wobei der korrespondierende 1-Alkohol entsteht. Durch die Analyse der Fettsäuremuster auf verschiedenen Substraten konnte festgestellt werden, dass besonders Alkene, aber auch iso-Alkohole im Gegensatz zu Alkanen von *D. oleovorans* bevorzugt werden. Das lässt vermuten, dass der Abbau von Alkanen für die Bakterienzellen mit einem höheren Energieverbrauch verbunden sein könnte. Die Gene der drei Untereinheiten der aktiven Alkanhydroxylase liegen mit weiteren Genen, die auf einen *bc1*-ähnlichen Komplex hindeuten, auf einem gemeinsamen apparenten Operon. Dies deutet daraufhin, dass alle

diese Proteine einen gemeinsamen membranständigen Komplex bilden. Innerhalb dieses Komplexes werden dann wahrscheinlich die Elektronen aus der Hydroxylierung der Alkane, die im Periplasma stattfindet, auf Menachinon in der Membran übertragen. Es handelt sich dabei um einen endergonen Elektronentransfer, der wahrscheinlich mit einer Investition von Energie verbunden ist.

Gegenüber *D. oleovorans* unterscheidet *D. alkenivorans* zwar auch zwischen Alkanen und Alkenen, aber nicht im gleichen Maße. Als induziertes Enzym in Hexadecan-Kulturen konnte einzig die Alkylsuccinatsynthase detektiert werden, welche die Addition von Fumarat an die Methylgruppe des Alkans katalysiert. Anhand der Fettsäuremuster konnte bestätigt werden, dass *D. oleovorans* im Gegensatz zu *D. alkenivorans*, welches Alkane durch Fumarat-Addition abbaut, einen anderen Abbaumechanismus haben muss. Beim Abbau eines ungeradkettigen 2-Alkohols wurden bei *D. alkenivorans* hauptsächlich geradkettige Fettsäuren detektiert. Wurde dahingegen ein ungeradkettiges Alkan abgebaut, entstanden hauptsächlich ungeradkettige Fettsäuren. Bei *D. oleovorans* wurden dahingegen sowohl beim Abbau eines ungeradkettigen Alkans, als auch eines ungeradkettigen 2-Alkohols geradkettige Fettsäuren detektiert. Das lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass der 2-Alkohol ein Abbauprodukt des Alkanmetabolismus in *D. oleovorans* ist.

In Alken-abbauenden Kulturen beider Stämme konnten keine spezifisch induzierten Enzyme detektiert werden. Es wurde aber gezeigt werden, dass das jeweils initiale Enzym des Alkenabbaus in *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* nicht Wolfram abhängig ist, wie die Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus*, welche die Addition von Wasser an die Dreifachbindung von Acetylen katalysiert. Potentielle Gene aus *D. oleovorans*, die für ein Acetylenhydratase-ähnliches Enzym zum Abbau von Alkenen kodieren, wurden in einen selbst isolierten *Pseudomonas stutzeri* Stamm eingebracht, der 1-Hexadecanol, aber kein Hexadecen, abbauen kann. Es konnte gezeigt werden, dass Wachstum auf Hexadecen unter aeroben Bedingungen mit zwei der potentiellen Gene, die für das mögliche Enzym des initialen Schritts des Alkenabbaus codieren, wahrscheinlich möglich war. Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnte dieser Versuch leider nicht noch einmal wiederholt werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen einen neuen Abbauweg von Alkanen durch *D. oleovorans* und stellen eine Grundlage für weitere Experimente zur Erforschung des Alkenabbaus durch Sulfat reduzierende Mikroorganismen dar.

Summary

Alkanes and alkenes are components of crude oil. Consequently, they are unfortunately part of the environment. The degradation of these components is very important, because of the increasing global pollution caused by crude oil and other fuels. These hydrocarbons are degraded anaerobically by mono- and dioxygenases. The most known anaerobic bacteria degrade alkanes via fumarate addition. However, there are some other anaerobic microorganisms that also degrade alkanes in a different way, but the exact mechanisms of action are still unknown. Former findings of alkene degradation show that a hydration of the double bond of the alkene could be the initial reaction. *Desulfococcus oleovorans* strain Hxd3 and *Desulfatibacillum alkenivorans* strain AK-01 are well-known sulfate-reducing bacteria, which degrade alkanes and alkenes anaerobically. *D. alkenivorans* degrades alkanes via fumarate addition. In contrast, *D. oleovorans* uses a different, not fully characterized metabolic pathway. Nevertheless, it is still known that the strain contains genes, which encode for an enzyme, which has a high sequence similarity to the ethylbenzenedehydrogenase (EBDH) of *Aromatoleum aromaticum*.

The main aim of this work was to characterize the alkane and alkene degradation by sulfate-reducing bacteria under anaerobic conditions and to analyse the possible involvement of the EBDH-like enzyme of *D. oleovorans* on the anaerobic alkane and alkene metabolism.

We detected induced proteins in cells of *D. oleovorans*, which were grown on hexadecane. Using MALDI-TOF analyses, these proteins were identified as subunits of the EBDH-like enzyme. The enzyme was called alkanehydroxylase in this thesis, because of its supposed ability to catalyse the hydroxylation of the alkane to the corresponding iso-alcohol. We could also detect small amounts of the corresponding intermediate 2-hexadecanol in an extract of a hexadecane-degrading culture of *D. oleovorans* by GC/MS analyses. The theory that a hydration reaction is the initial step of the alkene degradation to the corresponding 1-alcohol by sulfate-reducing bacteria forms the basis for our analyses. The evaluation of the fatty acid pattern of different substrates showed that *D. oleovorans* prefers alkenes and iso-alcohols instead of alkanes. One explanation for this observation could be that the bacteria need more energy to activate alkanes. The genes of the three subunits of the active alkane hydroxylase lie together with other genes on an apparent operon. All these proteins together may form a membrane-bound complex. In this complex electrons of the hydroxylation reaction, which takes place on the periplasm side, were may transferred to menaquinone, which is located in the membrane. The endergonic electron transfer is probably linked to energy consumption.

D. alkenivorans discriminates between alkanes and alkenes but not as much as *D. oleovorans*. In hexadecane-degrading cultures of *D. alkenivorans* only the alkylsuccinate synthase was detected as induced protein. This enzyme catalysis the addition of fumarate to

the methyl group of the alkane. Using the fatty acid pattern, we were able to show that *D. oleovorans* has a different degradation pathway than *D. alkenivorans*, which degrades alkanes by fumarate addition. Products of the degradation of an odd-chain iso-alcohol were mostly even-chain fatty acids in *D. alkenivorans*. In contrast, odd-chain alkanes were degraded to odd-chain fatty acids. Nevertheless, *D. oleovorans* mainly produced even-chain fatty acids independent of the substrate (odd-chain iso-alcohols or odd-chain alkanes). The results could indicate that the 2-iso-alcohol is a metabolite of the anaerobic alkane metabolism of *D. oleovorans*.

We could not detect any specific induced proteins in both strains, when alkenes were used as substrates. However, we found that the initial enzyme of the alkene degradation in both strains is not dependent on tungsten such as the acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*, which catalyses the addition of water to the triple bond of acetylene. Genes of *D. oleovorans* which could encode for an acetylenehydratase-like enzyme, which is necessary for the alkene degradation, were transferred into an isolated strain of *Pseudomonas stutzeri*, which is able to grow on 1-hexadecanol but not on hexadecene. It was possible to detect growth of hexadecene-growing cultures under aerobic conditions with two of the potential alkene degrading enzymes of *D. oleovorans*. A repetition of the experiments was not possible in the time of this doctoral research.

This doctoral thesis shows a new alkane degrading pathway of *D. oleovorans*. The results form the basis for further experiments to investigate the alkene degradation by sulfate-reducing microorganisms.

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DH	Dehydrogenase
d.h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMPD	N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ε	Extinktionskoeffizient
EBDHL	Ethylbenzoldehydrogenase ähnlich
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alli (lat.: und andere)
FAMEs	Fettsäuremethylester
ggf.	gegebenfalls
i.d.R.	in der Regel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
min	Minute
MWCO	Molecular weight cut-off
m/z	Masse zu Ladung
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
OD _n	Optische Dichte bei n nm

PCR	Polymerasekettenreaktion
PMS	5-Methylphenaziniummethylsulfat
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s.u.	siehe unten
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TMBZ	Tetramethylbenzidin Natriumsalz
upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
üN	über Nacht
Vol.	Volumen
v/v	Volume Per Volume
w/v	Weight Per Volume
z.B.	zum Beispiel

Einleitung

1. Bakterieller Abbau von Kohlenwasserstoffen

Kohlenwasserstoffe, die auch in dieser Arbeit als Substrate verwendet wurden, setzen sich aus Kohlenstoff und Wasserstoff zusammen. Sie lassen sich unterteilen in Alkane, Cykloalkane, Alkene, Arene und Alkine. Kohlenwasserstoffe kommen natürlicherweise zu einem Großteil in Erdöl vor (somit auch in Diesel, Benzin und anderen Kraftstoffen), was deren Abbau besonders bedeutsam macht. Daher ist es auch heute, zu Zeiten von Tankerunglücken etc. umso wichtiger, zu untersuchen, wie solche Verbindungen auch unter anaeroben Bedingungen abgebaut werden. Alkane und Alkene gehören zu den aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Es sind hydrophobe Verbindungen, die mit zunehmender Länge der Kohlenstoffkette, immer wasserunlöslicher werden. Viele Bakterien, die diese Substanzen abbauen, lagern sich daher direkt an deren Oberfläche an. Der aerobe Abbau von Kohlenwasserstoffen kann durch Mono- und Dioxygenasen erfolgen, wobei ein Angriff terminal am Ende des Moleküls, oder subterminal am zweiten Kohlenstoffatom erfolgt. In beiden Fällen ist das Produkt der entsprechende korrespondierende Alkohol. Nach einigen weiteren Reaktionen entsteht eine Fettsäure die durch die β -Oxidation weiter abgebaut wird.

1.1 Aerober Abbau von Alkanen

Bei Alkanen handelt es sich um azyklische gesättigte Kohlenwasserstoffe, die aus einer Kohlenstoffkette bestehen, die unterschiedlich lang sein kann und keine Doppel- oder Dreifachbindung aufweist. Verzweigte Alkane werden als iso-Alkane und unverzweigte als n-Alkane bezeichnet. Insbesondere das langkettige n-Hexadecan spielt in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle. Kurzkettige Alkane sind toxischer und leicht entflammbar. Ab einer Kettenlänge von C_{17} haben Alkane bei Raumtemperatur einen festen Aggregatzustand, kurzkettigere Alkane sind gasförmig (Methan – Butan) oder flüssig (Pentan-Heptadecan). Der aerobe Abbau von Alkanen erfolgt meist über einen terminalen Angriff durch Monooxygenasen, seltener durch subterminale Oxidation. Die Monooxygenasen katalysieren die Reaktion bei der ein Sauerstoffatom auf das Alkan übertragen wird. Das Resultat ist ein primärer (terminale Monooxygenase) bzw. sekundärer Alkohol (subterminale Monooxygenase). Als Elektronenakzeptor der Hydroxylierung fungiert häufig NAD(P)H (Van Beilen and Funhoff, 2007). Der primäre Alkohol wird weiter über das Aldehyd zur korrespondierenden Fettsäure abgebaut. Der sekundäre Alkohol wird zum Keton und anschließend zum Ester oxidiert, wodurch Acetat und der entsprechende primäre Alkohol entstehen, der weiter zur Fettsäure umgesetzt wird. Die nicht so häufig vorkommenden Dioxygenasen übertragen zwei Sauerstoffatome auf das Alkan. Das durch die Dioxygenase

entstandene Alkan-Peroxid wird reduziert, dabei wird Wasser abgespalten und der primäre Alkohol entsteht. Der primäre Alkohol wird wiederum zu den entsprechenden Fettsäuren abgebaut (siehe Abb. 2). Der anschließende Abbau der Fettsäuren in der β -Oxidation unterscheidet sich für Verbindungen mit gerader oder ungerader Anzahl an C-Atomen. Geradkettige Fettsäuren werden zu Acetyl-CoA abgebaut, welches im Citrat-Zyklus zur Energiegewinnung genutzt werden kann. Ungeradkettige Fettsäuren werden zu Propionyl-CoA oxidiert. Dieses wird durch weitere Reaktionsschritte in Succinyl-CoA umgewandelt, welches ebenfalls im Citratzyklus genutzt wird.

Die Enzyme, die den aeroben Abbau von Alkanen katalysieren, unterscheiden sich je nach Kettenlänge des abzubauenen Alkans. Der initiale Schritt des Abbaus von Alkanen mit einer Kettenlänge von C_2 bis C_4 wird von der Methan-Monooxygenase bzw. ähnlichen Enzymen katalysiert (Hamamura et al., 1999; Rojo, 2009). Die Hydroxylierung von mittellangen Alkanen (C_5 bis C_{11}) und langkettigen Alkanen ($> C_{12}$) wird von nicht-Hämeisen Monooxygenasen katalysiert, welche membranständig sind. Aber auch Enzyme, die zur Familie der löslichen P450 Cytochrome gehören, sind in der Lage, Alkane mit einer Kettenlänge von fünf bis elf Kohlenstoffatomen zu hydroxylieren (Rojo, 2009; van Beilen et al., 2006). Alkane mit einer Länge von mehr als 18 C-Atomen werden von Alkanooxygenasen abgebaut, diese wurden aber bisher noch nicht näher beschrieben (Van Beilen and Funhoff, 2007). Bakterien die Monooxygenasen oder Monooxygenase-ähnliche Enzyme zum Abbau von Alkanen besitzen, sind *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylomonas*, *Methylocella*, *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* und *Pseudomonas* (McDonald et al., 2006; Van Beilen et al., 2003). *Acinetobacter* sp. M-1 besitzt eine Dioxygenase und die Gattungen *Acinetobacter* und *Alcanivorax* haben P450 Cytochrome, die sie für den Alkan Metabolismus einsetzen (Maeng et al., 1996; van Beilen et al., 2006).

2. Aerober Abbau von Alkenen

Alkene sind eine weitere wichtige Gruppe der Kohlenwasserstoffe und in der vorliegenden Arbeit neben den Alkanen von besonderem Interesse. Sie sind azyklische, ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die aus einer Kohlenstoffkette (verzweigt oder unverzweigt) bestehen, die mindestens eine Doppelbindung aufweist. Alkene sind reaktionsfreudiger als Alkane, da die Doppelbindung gegenüber einer Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung relativ instabil ist und somit schneller aufgebrochen werden kann.

Methylothrophe Bakterien mit einer Methan-Monooxygenase können Propen (C_3H_6) zu dem korrespondierenden 1,2-Epoxid oxidieren. Dieses Produkt reichert sich extrazellulär an und kann nicht weiter abgebaut werden (Hou et al., 1979). Im Gegensatz dazu können Bakterien, die mit Propan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und eine Propan-

Monooxygenase besitzen, auch Propen weiter abbauen. Die Oxidation kann bei diesen Bakterien sowohl an der Doppelbindung, als auch an der Methylgruppe erfolgen (Hou et al., 1983). Eine Nichteisen-Alken-Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 ist in der Lage, kurzkettige aliphatische Alkene mit einer Kettenlänge von C₂ bis C₆ anzugreifen. Das Enzym katalysiert dabei die Epoxidation des Alkens, welche sowohl O₂- als auch NADH-abhängig ist (Small and Ensign, 1997). Das Propenoxid (1,2-Epoxypropan) wird zunächst wahrscheinlich durch ein Epoxidase-Enzym zur Keto- oder Enolform des Acetons isomerisiert. Bei Abwesenheit von CO₂ wird das Intermediat vom aktiven Zentrum des Enzyms als Aceton freigesetzt. Möglicherweise unterliegt das Enolat dabei einer irreversiblen Protonierung, wodurch Aceton entsteht. Ist dagegen CO₂ vorhanden, dient das Anion der Enolform des Acetons wahrscheinlich als das Intermediat, welches carboxyliert wird, wobei Acetoacetat entsteht, welches weiter zu zwei Molekülen Acetyl-CoA umgewandelt wird. Diese gehen dann in den zentralen Stoffwechsel ein (Small and Ensign, 1995).

Die Alken-Monooxygenase aus Zellen von *Xanthobacter* Py2 welche auf Propen gewachsen sind, kann auch einige chlorierte Alkene (Trichlorethylen, 1-Chlorethylen, *cis* und *trans*-1,2-Dichlorethylen, 1,3-Dichlorpropylen und 2,3-Dichlorpropylen) abbauen. In geringer Konzentration stimuliert Propen die Oxidation von chlorierten Alkenen (Ensign, 1996; Ensign et al., 1992). Nach der Oxidation von Ethen bzw. 1-Chlorethylen zu den entsprechenden Epoxiden durch die Alken-Monooxygenase, werden diese durch die Epoxyalkan Coenzym M Transferase zu Coenzym-M Konjugaten umgewandelt. Die Konjugate werden durch eine Alkoholdehydrogenase zu 2-Ketoethyl-CoM oxidiert. Durch eine weitere Reaktion, die durch eine CoM Reduktase/Carboxylase katalysiert wird, entsteht Malonat-Semialdehyd und reduziertes Coenzym M. Eine bifunktionale Aldehyd-/Alkoholdehydrogenase wandelt das Semialdehyd in Malonat um, welches weiter zu Acetyl-CoA umgesetzt wird siehe Abb. 1 (Mattes et al., 2010).

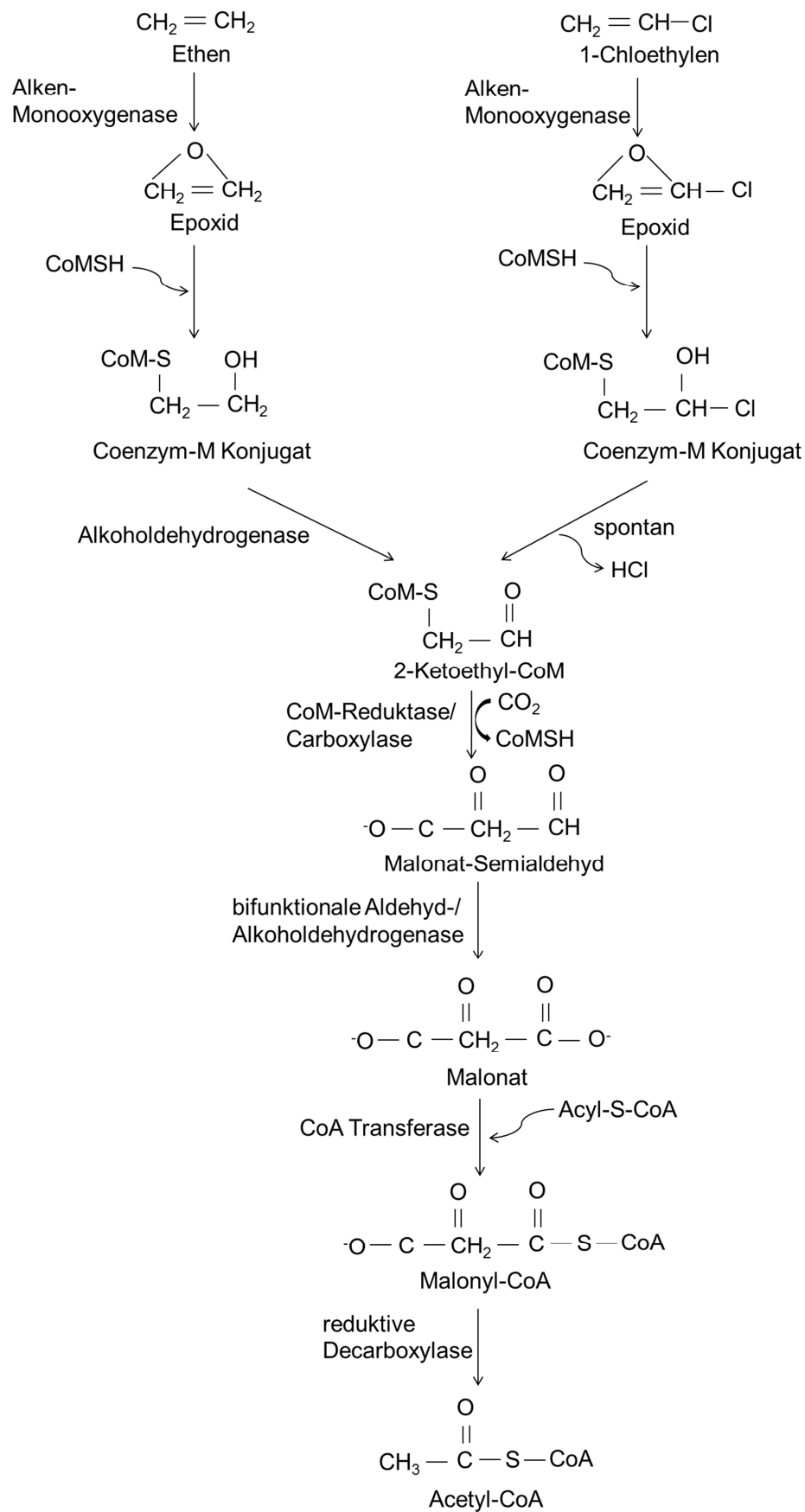


Abb. 1: Postulierter aerober Abbau von Ethen bzw. 1-Chlorethen durch *Xanthobacter* Stamm Py2 (Mattes et al., 2010).

Die Methan-Monooxygenase hat im Gegensatz zur Alken-Monooxygenase ein relativ unspezifisches Substratspektrum. Die Methan-Monooxygenase aus *Methylosinus trichosporium* OB3b kann chlorierte, fluorierte und bromierte Alkene sowie Trichlorethylen oxidieren (Fox et al., 1990).

3. Anaerober Abbau von Alkanen

Der anaerobe Abbau von Alkanen ist ein zentrales Thema dieser Arbeit und bisher wurden eine Carboxylierung oder eine Additionsreaktion als mögliche initiale Reaktionen des anaeroben Alkan Metabolismus postuliert (Callaghan et al., 2006; Rabus et al., 2001; So et al., 2003). In dem nitratreduzierenden *Azoarcus* sp. Stamm HxN1, welcher anaerob auf n-Hexan wachsen kann, wurde durch ^{13}C und mit Deuterium markiertes n-Hexan gezeigt, dass die Seitenkette des Produktes (1-methylpentyl)Succinat direkt auf das Hexan zurückzuführen ist. Es wurde gefolgert, dass eine Fumarat-Addition am C_2 des Alkans stattfindet und dieses dabei aktiviert wird (Rabus et al., 2001). Ein ähnliches Produkt entsteht auch beim anaeroben Abbau von Toluol. Dort wird die Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat addiert, das Resultat ist R-Benzylsuccinat (Biegert 1996). Bei dem Sulfat reduzierenden *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 konnte durch Experimente mit markiertem Alkan gezeigt werden, dass auch dort eine Fumarat-Addition zur Aktivierung des Alkans stattfindet. Es konnten Methylpentadecyl Bernsteinsäure und andere Metabolite, die auf eine Fumarat-Addition hinweisen, nachgewiesen werden. Ein Hinweis, der auf eine Carboxylierung des Alkans in diesem Stamm hindeutet, wurde nicht gefunden (Callaghan et al., 2006). Das Glycylradikal-Enzym, welches die Reaktion des anaeroben Abbaus von Toluol in *Thauera aromatica* katalysiert, ist die Benzylsuccinatsynthase (Bss) (Biegert et al., 1996; Leuthner and Heider, 2000; Leuthner et al., 1998; Leutwein, 2000). Ähnliche Gene wurden auch in *D. alkenivorans* gefunden, diese kodieren für zwei Alkylsuccinatsynthasen (Ass). Die AssA1 soll die initiale Reaktion des Abbaus von Hexadecan in *D. alkenivorans* katalysieren. Sie wurde nur in Zellen gefunden, die auf Hexadecan, nicht jedoch auf Hexadecanoat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Weitere Gene des Operons in dem sich auch die AssA1 befindet, kodieren für eine langkettige Fettsäure CoA-Ligase und eine Enoyl-CoA Hydratase. Beide Enzyme sind direkt an der Aktivierung und Hydratation von Fettsäuren in der β -Oxidation beteiligt. Die AssA2 ist wahrscheinlich am Abbau anderer Substrate beteiligt (Callaghan et al., 2008). Auch weitere anaerobe Bakterien nutzen die Fumarat-Addition zum Abbau von Alkanen wie z. B. eine Sulfat reduzierende Bakterienkultur, bei der nachgewiesen wurde, dass sie Alkane mit einer Kettenlänge von C_6 bis C_{12} durch die Addition an Fumarat aktiviert (Davidova et al., 2005). Auch der Denitrifizierer *Azoarcus* sp. Stamm HxN1 greift n-

Hexan über diesen Weg an, wobei auch hier die Gene, die für die entsprechenden Enzyme (Mas) kodieren, ähnlich zu den Bss Genen sind (Grundmann et al., 2008; Rabus et al., 2001; Wilkes et al., 2002). Weitere Bakterienstämme, die Fumarat-Addition als initialen Schritt des anaeroben Alkanabbaus nutzen, sind die Sulfatreduzierer *Desulfatibacillum aliphaticivorans* (Cravo-Laureau et al., 2004a) und wahrscheinlich auch *Desulfatibacillum* sp. Stamm Pnd3 (Aeckersberg et al., 1998). Ein Konsortium welches aus mit Kohlenwasserstoffen belastetem Sediment stammt, kann Alkane sowohl durch Fumarat-Addition, als auch durch Carboxylierung abbauen. Das zeigt, dass auch mehrere Mechanismen zum anaeroben Alkanabbau nebeneinander existieren können (Callaghan et al., 2006). Neben der Fumarat-Addition als initialem Schritt des anaeroben Alkanabbaus, wird auch eine Carboxylierung als Alkan aktivierende Reaktion postuliert (So et al., 2003). Es wurden Metabolite in mit ^{13}C oder Deuterium markiertem Hexadecan gewachsenen Zellen, von *Desulfococcus oleovorans* Stamm Hxd3, nachgewiesen, die darauf hinweisen, dass in diesem Stamm der initiale Schritt des Alkanabbaus eine subterminale Carboxylierungsreaktion am C_3 ist (Callaghan et al., 2006; So et al., 2003). Das daraus resultierende Produkt konnte allerdings nicht detektiert werden. Es wurde postuliert, dass nach der Carboxylierung ein Schritt erfolgt, in dem zwei terminale Kohlenstoffatome eliminiert werden, wodurch eine Fettsäure entsteht, die in Bezug auf das Alkan um ein C-Atom verkürzt ist. Die Fettsäure wird in der β -Oxidation weiter umgesetzt und schließlich zu CO_2 mineralisiert bzw. zu anderen Fettsäuren umgewandelt (So et al., 2003). In einem Konsortium aus dem mit Petroleum verschmutzten Sediment des Onondaga Sees (USA) wurden ebenfalls Metabolite nachgewiesen, die auf eine subterminale Carboxylierung des Alkans als aktivierenden Schritt hinweisen. Allerdings konnte das daraus resultierende Metabolit wiederum nicht detektiert werden, was für ein eventuell sehr kurzlebiges Produkt spricht. Die Aktivierung könnte aber auch auf einem anderen Weg erfolgen (Callaghan et al., 2009).

4. Anaerober Abbau von Alkenen

Über den anaeroben Metabolismus von Alkenen ist noch sehr wenig bekannt und folglich ist das Interesse an der Erforschung dieses Themas besonders groß. Es gilt aber als sicher, dass Alkene keine Abbauprodukte des Alkanmetabolismus sind und beide auf unterschiedlichen Wegen abgebaut werden (Aeckersberg et al., 1998). Es gibt einige Mikroorganismen, von denen bekannt ist, dass sie Alkene abbauen können (siehe Tab. 1), auch wenn der genaue Mechanismus und die daran beteiligten Enzyme noch nicht genau bekannt sind.

Tab. 1: Bekannte Mikroorganismen, die Alkene als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können.

Organismus	genutzte Alkene	Referenz
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> Stamm AK-01	C ₁₅ / C ₁₆	(So and Young, 1999b)
<i>Desulfococcus oleovorans</i> Stamm Hxd3	C ₁₆ / C ₁₇	(Aeckersberg et al., 1991; Aeckersberg et al., 1998)
<i>Pseudomonas</i> sp. Stamm A11	C ₁₇	(Gilewicz et al., 1991)
<i>Desulfatibacillum</i> sp. Stamm Pnd3	C ₁₆	(Aeckersberg et al., 1998)
<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i> Stamm CV2803 ^T	C ₇ - C ₂₃	(Cravo-Laureau et al., 2004a)
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> Stamm PF2803 ^T	C ₈ - C ₂₃	(Cravo-Laureau et al., 2004b)
<i>Desulfatiferula olefinivorans</i> Stamm LM2801 ^T	C ₁₄ - C ₂₃	(Cravo-Laureau et al., 2007)
<i>Desulfatiferula berrensis</i> Stamm BE2801 ^T	C ₁₂ - C ₂₀	(Hakil et al., 2014)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	C ₁₂ - C ₂₁	(Khelifi et al., 2010)

Studien mit *Desulfatibacillum aliphaticivorans* Stamm CV2803^T und deuterierten 1-Alkenen sowie ¹³C markiertem Bicarbonat haben gezeigt, dass eine Oxidation am C₁ des Alkens stattfindet und der primäre Alkohol entsteht, der weiter zur korrespondierenden Fettsäure abgebaut wird. Weiterhin konnten entsprechende Fettsäuren detektiert werden, die auf eine Kohlenstoffaddition (von organischem Kohlenstoff) am C₂, am C-(ω-1) und am C₃ hinweisen. Eine Addition von anorganischem Kohlenstoff konnte durch den Einsatz von markiertem Bicarbonat ausgeschlossen werden. Alkylsuccinate, die für eine Fumarat-Addition sprechen, wurden unter Einsatz von markiertem Fumarat nicht nachgewiesen, trotzdem wird auch die Möglichkeit der Fumarat-Addition als aktivierender Schritt des anaeroben Alkenabbaus in diesem Stamm nicht ausgeschlossen (Grossi et al., 2007). Eine weitere Hypothese wie Alkene anaerob abgebaut werden können, ist durch eine Hydratationsreaktion der Doppelbindung, wobei der korrespondierende Alkohol entsteht (anti-Markownikoff Reaktion). Dieser Mechanismus wurde bei einer Anreicherungskultur von Methanogenen vermutet, die 1-Alkene abbauen und auch auf langkettigen Alkoholen wachsen (Schink, 1985). Auch für Bakterien der Gattung *Desulfatiferula* (*Desulfatiferula olefinivorans* Stamm LM2801^T und *Desulfatiferula* sp. Stamm BE2801) wurde dieser Mechanismus zum Alkenabbau diskutiert. Für beide Stämme wurde gezeigt, dass sie Deuterium-markierte n-Alkene an der Doppelbindung oxidieren, sodass der korrespondierende Alkohol und die entsprechende

Fettsäure entstehen. Des Weiteren konnten ebenfalls Fettsäuren detektiert werden, die auf eine Oxidation am C₂ bis C₅ hindeuten, wodurch ein sekundärer Alkohol entsteht. Zuvor würde wahrscheinlich eine Isomerisierung des Substrates erfolgen. Eine Addition von Kohlenstoff konnte nicht nachgewiesen werden. Als nachfolgender Schritt wird der Alkohol zum Keton oxidiert und der weitere Abbau führt zur korrespondierenden Fettsäure. Die entsprechenden Ketone konnten in beiden Stämmen detektiert werden (Grossi et al., 2011). Dass die initiale Oxidation an der Doppelbindung eine Hydratisierung ist, konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Eine Zusammenfassung der bisher bekannten aeroben und anaeroben Abbaumechanismen von Alkanen und Alkenen wurde in Abb. 2 dargestellt.

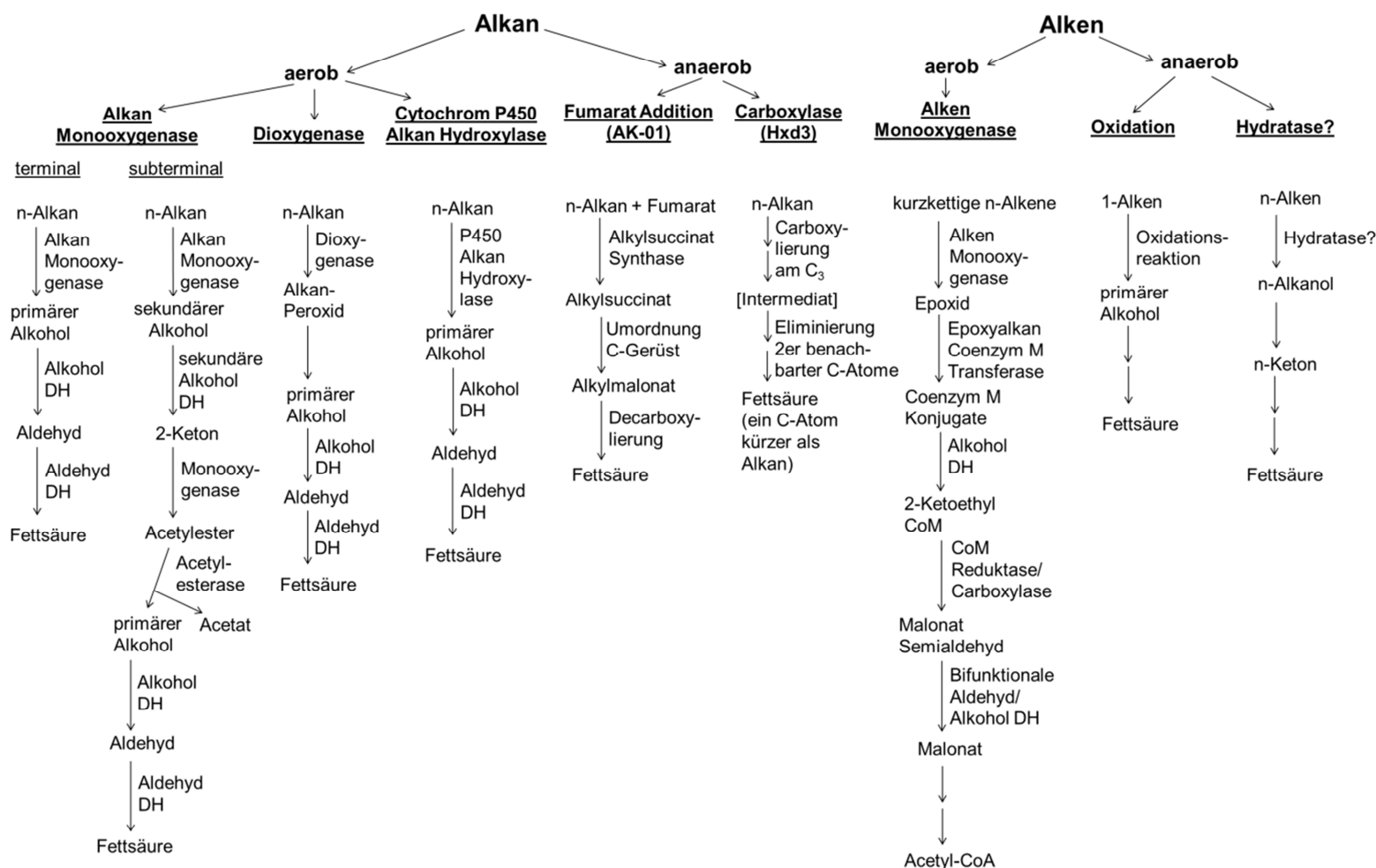


Abb. 2: Zusammenfassung der aeroben und anaeroben Abbauewege von Alkanen und Alkenen. Die fettgedruckten Enzyme katalysieren die initiale Reaktion des jeweiligen Abbaumechanismus bzw. ist die Oxidation eine mögliche Reaktion, die den anaeroben Abbau von Alkenen aktiviert. (Callaghan et al., 2006; Georg Fuchs, 2007; Grossi et al., 2011; Maeng et al., 1996; Mattes et al., 2010; Schink, 1985; van Beilen et al., 2006)

5. Ethylbenzoldehydrogenase

Ein Enzym welches für den Abbau des aromatischen Kohlenwasserstoffes Ethylbenzol verantwortlich ist, ist die Ethylbenzoldehydrogenase (EBDH). Dadurch wird der initiale Schritt des anaeroben Ethylbenzolmetabolismus in dem denitrifizierenden Bakterium *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 katalysiert. Es handelt sich um eine Sauerstoff unabhängige Hydroxylierung, die im Periplasma durch das lösliche Enzym stattfindet, wodurch (S)-1-Phenylethanol entsteht. Dieses wird im Cytoplasma weiter durch die (S)-1-Phenylethanoldehydrogenase zum entsprechendem Keton oxidiert (Kniemeyer and Heider, 2001; Rabus and Widdel, 1995). Das Acetophenon wird weiter zu Benzoylacetat carboxyliert, das dann durch eine Ligase zu Benzoylacetyl-CoA umgewandelt und anschließend durch eine Thiolase zu Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA umgesetzt wird (Kniemeyer and Heider, 2001; Rabus et al., 2002). Drei Gene (*ebdABC*) kodieren für die Ethylbenzoldehydrogenase, wobei ein viertes Gen (*ebdD*) als Chaperon fungiert und für die Reifung und den korrekten Einbau des Molybdän Cofaktors verantwortlich ist (Rabus et al., 2002). Bei der EBDH handelt es sich um ein Heterotrimer, welches sich aus den Untereinheiten α (96 kDa), β (43 kDa) und γ (23 kDa) zusammensetzt (Kloer et al., 2006; Kniemeyer and Heider, 2001). Die α -Untereinheit beinhaltet das aktive Zentrum mit einem Molybdän *bis*-Molybdopteringuanindinukleotid Cofaktor und einen 4Eisen-4Schwefel (4Fe-4S) Cluster. Die β -Untereinheit beinhaltet vier Eisen-Schwefel Cluster und ist strukturell dem Ferredoxin sehr ähnlich. Drei der vier Eisen-Schwefel Cluster sind 4Fe-4S Cluster, bei einem handelt es sich um einen 3Fe-3S Cluster. Die γ -Untereinheit enthält einen Häm *b* Cofaktor (Kloer et al., 2006). Die EBDH gehört somit zu den Molybdän/Eisen-Schwefel Proteinen (Johnson et al., 2001). Das Enzym wird daher der Dimethylsulfoxid (DMSO) Reduktase Familie II von Molybdän *bis*-Molybdopteringuanindinukleotid Enzymen zugeordnet (Hille, 1996). Als Elektronenakzeptor bei der Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol durch die EBDH dient Ferricenium, welches wieder regeneriert werden kann (Szaleniec et al., 2007). Die Ethylbenzoldehydrogenase ist relativ unspezifisch und kann ein weites Spektrum an Substraten nutzen. Dazu gehören verschiedene Derivate des Ethylbenzols: Verbindungen mit verlängerten Alkylsubstituenten, mit ortho-, meta-, und para-Substituenten oder Verbindungen, die Substituenten mit Doppel- und Dreifachbindungen enthalten. Des Weiteren kann das Enzym auch bizyklische Substanzen wie Indan, Coumaran und einige weitere als Substrat nutzen (Knack et al., 2012). Eine Inhibition der Dehydrogenase erfolgt durch sekundäre Alkohole (Szaleniec et al., 2007), aber auch durch Toluol, 2-Methylfuran oder 2-Methylthiopen (Methyl-substituierte Verbindungen), Styrol, Indan und Indol (Verbindungen mit einer Doppelbindung zwischen dem ersten und zweiten Kohlenstoffatom des an einem Benzolring sitzenden Alkylsubstituenten), sowie durch Verbindungen mit Ethylsubstituenten. Offenbar binden unpolare Substrate besser an das aktive Zentrum der

Ethylbenzoldehydrogenase als polare (Knack et al., 2012). Die EBDH aus *Azoarcus* sp. Stamm EB1, die ebenfalls Ethylbenzol zu (S)-1-Phenylethanol hydroxyliert, kann Styrol, 4-Chlor-Ethylbenzol oder Ethyltoluol nicht abbauen, ist aber in der Lage, 4-Fluorethylbenzol und Propylbenzol als Substrat zu nutzen (Johnson and Spormann, 1999). Die EBDH aus *A. aromaticum* wird in Anwesenheit von Sauerstoff schneller inaktiviert, als unter anaeroben Bedingungen (Knack et al., 2013).

6. Ethylbenzoldehydrogenase ähnliche Enzyme

Es gibt einige Enzyme, die der Ethylbenzoldehydrogenase strukturell sehr ähnlich sind. Dazu gehört die Dimethylsulfiddehydrogenase aus *Rhodovulum sulfidophilum* (McDevitt et al., 2002), die Selenatreduktase aus *Thauera selenatis* (Schroder et al., 1997) und die respiratorische Nitratreduktase aus *Escherichia coli* (Blasco et al., 1989; Weiner et al., 1988). Alle Enzyme besitzen wie die EBDH einen mononuklearen Molybdän bis-Molybdopteringuanidinukleotid Cofaktor, welcher eine Vielzahl an Sauerstofftransfer Reaktionen katalysiert (Fourmond et al., 2008). Bis auf die respiratorische Nitratreduktase, die membranständig ist, kommen die anderen Proteine im Periplasma vor. Die EBDH, Selenatreduktase und Dimethylsulfiddehydrogenase besitzen ein *b*-Typ Häm, während die Nitratreduktase ein di-Häm (Typ *b*) besitzt welches Quinol oxidiert. Alle Häm-Typen die sich in der γ -Untereinheit befinden und auch die Eisen-Schwefel Cluster in der β -Untereinheit, die alle Enzyme der DMSO Reduktase Familie Untergruppe II besitzen, sind für den Transport der Elektronen aus der initialen Reaktion zuständig (Hanlon et al., 1996; Kniemeyer and Heider, 2001; McDevitt et al., 2002; Schroder et al., 1997). Die γ -Untereinheit überträgt letztendlich die Elektronen auf einen entsprechenden Elektronenakzeptor. Besonders die Selenatreduktase, die Ethylbenzoldehydrogenase und die Dimethylsulfiddehydrogenase können mit ihrer Elektronentransportkette auf der Ebene von Cytochrom *c*/Cytochrom *bc*₁ Komplexen interagieren. Durch das hohe Redoxpotential der terminalen Elektronenakzeptoren ist es wahrscheinlich erst möglich, die jeweiligen aktivierenden Reaktionen wie die Oxidation von Ethylbenzol durch zu führen.

Ein weiteres Enzym, das der EBDH sehr ähnelt, ist die Steroid C₂₅ Hydroxylase aus *Sterolibacterium denitrificans*. Sie katalysiert den anaeroben Abbau von Cholesterol, wobei das Enzym das tertiäre C₂₅ Atom der Seitenkette des Cholesterols hydroxyliert und der tertiäre Alkohol entsteht. Die Hydroxylase ist membranassoziiert und befindet sich auf der periplasmatischen Seite. Sie ist wie die EBDH als ein $\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimer aufgebaut. Die α -Untereinheit beinhaltet einen Molybdän bis- Pyranopteringuanidinukleotid Cofaktor und einen Eisen-Schwefel Cluster, die β -Untereinheit besitzt vier weitere Eisen-Schwefel Cluster und die γ -Untereinheit ein Häm *b* (Dermer and Fuchs, 2012; Heider et al., 2016). In dem

Sulfatreduzierer *Desulfococcus oleovorans* wurden Gene gefunden, die eine große Ähnlichkeit mit denen der Ethylbenzaldehydrogenase haben und es wird vermutet, dass diese am anaeroben Abbau von Alkanen beteiligt sein könnten (Heider and Schühle, 2013). Auch die *p*-Cymoldehydrogenase aus dem Denitrifizierer *A. aromaticum* Stamm pCyN1 weist einige Ähnlichkeiten zur EBDH auf. Ähnlich der EBDH katalysiert das Enzym die Reaktion von *p*-Cymol zum korrespondierenden Alkohol, welcher weiter zum Aldehyd oxidiert wird (Harms et al., 1999; Strijkstra et al., 2014).

7. Sulfatreduzierer

Einige Sulfat reduzierende Bakterien sind in der Lage Alkane und Alkene abzubauen und sind somit eine geeignete Bakteriengruppe, um den Abbau dieser Kohlenwasserstoffe zu untersuchen. Sie nutzen Sulfat als Elektronenakzeptor und sind zumeist obligat anaerob. Sie gehören zu den Gram-negativen Bakterien und werden meistens den Proteobakterien, speziell der Delta-Untergruppe, zugeordnet. Sulfatreduzierer kommen sowohl in terrestrischen als auch in marinen Lebensräumen vor. Durch präzipitiertes Eisensulfid kommt die typische schwarze Farbe der Sedimente, in denen Sulfatreduzierer vorkommen, zustande. Durch Reduktion des Sulfats zu Sulfid bzw. Schwefelwasserstoff kann der typische Geruch nach faulen Eiern erklärt werden.

Die mit am besten untersuchten Sulfat reduzierenden Bakterien, die Alkane und Alkene abbauen können, sind *Desulfococcus oleovorans* Stamm Hxd3 und *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01. *D. oleovorans* wurde aus dem Bodensatz eines Öl-Wasser Trenners einer Ölförderungsanlage in der Nähe von Hamburg isoliert. Der Stamm kann auf Hexadecan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und dieses bis zum CO₂ mineralisieren. Die Zellen sind 0,8 µm bis 2 µm lang und 0,4 µm bis 0,5 µm breit. Es sind stäbchenförmige Bakterien, die leicht gebogen sein können. Sie können auch die Form eines kurzen Ovals haben. Das Wachstum erfolgt ziemlich langsam wie bei allen anaeroben Bakterien. *D. oleovorans* Stamm Hxd3 kann auf Alkanen mit einer Kettenlänge von C₁₂ bis C₂₀, auf Hexadecen, 1- und 2-Hexadecanol, α-Zyklodextrin, sowie den Fettsäuren Hexadecanoat und Stearat wachsen. Ein Wachstum auf Laktat, Ethanol oder Alkanen kürzer als C₁₂ konnte nicht nachgewiesen werden. Die Zellen haften der Alkanphase an, um diese besser angreifen zu können (Aeckersberg et al., 1991; Aeckersberg et al., 1998). Das Besondere an *D. oleovorans* ist das Fettsäuremuster, wenn der Stamm auf Alkanen wächst. Mit Hexadecan (C₁₆) als Substrat wurden Fettsäuren detektiert, die hauptsächlich eine ungerade Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Kette haben. Bei ungeradkettigen Alkanen verhält es sich entsprechend umgekehrt. Bei Wachstum auf geradkettigen Alkanen, haben die Fettsäuren eine gerade Anzahl an C-Atomen und umgekehrt. Das zeigt deutlich, dass

Alkane und Alkene in diesem Stamm auf unterschiedlichen Wegen abgebaut werden. *D. oleovorans* Stamm Hxd3 muss auch einen anderen Reaktionsmechanismus zur Aktivierung der Alkane als die Fumarat- Addition haben, da keine Hinweise darauf gefunden wurden und der Stamm auch keine Gene besitzt, die ähnlich zu den Ass Genen aus *D. alkenivorans* wären (Callaghan et al., 2006; Callaghan et al., 2012).

Desulfatibacillum alkenivorans Stamm AK-01 wurde aus mit Erdöl verschmutztem Flusssediment isoliert. Bei dem Stamm AK-01 handelt es sich um stäbchenförmige Bakterien, die 1 bis 1,5 µm lang und 0,5 µm breit sind, wenn sie auf Hexadecan wachsen. Bei Wachstum auf leichter abbaubaren Substraten wie Fettsäuren sind sie etwas länger (bis 2 µm). In der späten stationären Phase kugeln die Zellen sich ab. *D. alkenivorans* kann Alkane mit einer Kettenlänge von C₁₃ bis C₁₈, C₁₅ und C₁₆ Alkene und 1-Alkohole C₁₅ und C₁₆ als Substrat nutzen. Dabei lagern sich die Zellen an den Alkantröpfchen an, um im direkten Kontakt mit dem Substrat für dessen Abbau zu sorgen. Ein Wachstum auf Pyruvat, Benzoat oder Phenylacetat konnte nicht nachgewiesen werden. Auch *D. alkenivorans* kann Hexadecan bis zum CO₂ oxidieren, wie Studien mit ¹⁴C markiertem Hexadecan gezeigt haben. Wächst der Stamm AK-01 auf geradkettigen Alkanen, so dominieren auch Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kette, während Wachstum auf ungeradkettigen Alkanen zur vermehrten Produktion von ungradkettigen Fettsäuren führt (So and Young, 1999a; So and Young, 1999b). Der initiale Schritt des Alkanmetabolismus durch *D. alkenivorans* erfolgt durch die Addition von Fumarat an die subterminale Methylgruppe des Alkans, dabei wird die Reaktion wie bereits beschrieben durch die Alkylsuccinatsynthase katalysiert (Callaghan et al., 2006).

Ziel der Untersuchungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden für die verschiedenen Experimente genutzt, weil es sich um die mit am besten untersuchten Sulfat reduzierenden Bakterien handelt, die in der Lage sind, langkettige Alkane und Alkene anaerob abzubauen. Ein besonderes Anliegen dieser Arbeit sollte sein, nachzuweisen dass der 2-iso-Alkohol ein Abbauprodukt des anaeroben Alkanmetabolismus in *D. oleovorans* ist. Es ist bekannt, dass *D. oleovorans* 2-Hexadecanol als Substrat nutzen kann (Aeckersberg et al., 1991), aber niemand war bisher daran interessiert zu überprüfen, ob es sich bei dem Alkohol um ein Metabolit des Alkanabbaus handelt. Nach Möglichkeit sollte auch der weitere Abbauweg bzw. weitere Metabolite und Enzyme näher charakterisiert werden. Ebenfalls war die Untersuchung des anaeroben Alkenabbaus durch Sulfat reduzierende Bakterien ein Ziel dieser Arbeit. Als Hypothese wurde hier zu Grunde gelegt, dass die initiale Reaktion des Alkenmetabolismus möglicherweise durch ein Acetylenhydratase ähnliches Enzym katalysiert wird. Da die Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus* das einzige Enzym ist, welches Wasser an die Dreifachbindung von Acetylen hydratisieren kann (Tenbrink et al., 2011).

Material und Methoden

1. Verwendete Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Antibiotikaresistenz	Referenz
<i>Desulfococcus oleovorans</i> (Hxd3)	Wildtyp; DSM-Nr. 6200 (als <i>Desulfobacterium oleovorans</i>)	keine	(Aeckersberg et al., 1991)
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> (Ak-01)	Wildtyp; DSM-Nr. 16219	keine	(Cravo-Laureau et al., 2004b)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA</i> -argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺), phoA, supE44, λ-	Nalidixinsäure	(Woodcock et al., 1989)
<i>Escherichia coli</i> FM420	ähnlich MC4100, <i>recA56</i>	Streptomycin, Tetracyclin	(Zinoni et al., 1987)
<i>Escherichia coli</i> JM109	endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, recA1, mcrB ⁺ , Δ(<i>lac-proAB</i>) e14-[F' <i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15], hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺)	Nalidixinsäure	(Yanisch-Perron et al., 1985)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _K	Wildtyp; Eigenisolat	-	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> _K	Wildtyp; Eigenisolat	Streptomycin (100 µg/ml)	

2. Geräte

Alle aufgeführten Geräte wurden ordnungsgemäß und nach Vorschrift benutzt.

2.1 Elektrophorese

Gelkammern und Kämme für Agarosegele	Werkstatt
Gelkammern und Kämme für SDS-Page	Bio-Rad
UV-Tisch	Kobe
Stromquellen Enduro	Labnet International, Inc.

2.2 Spektralphotometer

Cary 60 UV-VIS	Agilent Technologies
Ultrospec 1100 pro UV-VIS	Amersham Biosciences
µQuant ELISA Reader	Bio-Tek Instruments, Inc.
ND-1000	Nanodrop

2.3 Zellaufschluss

Kugelmühle Mikro-Dismembrator S	B.Braun Biotech International
Sonifier 250 (Verwendung anaerob)	Branson
Sonoplus (Verwendung aerob)	Bandelin

2.4 Zentrifugen

Sorvall RC-5B Plus	Thermo Scientific
Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Optima L90-K Ultrazentrifuge	Beckman coulter
Biofuge fresco	Heraeus
Centrifuge 5403	Eppendorf
Universal 320 R	Hettich
MICRO STAR 17	VWR

2.5 weitere Geräte

Autoklav Hiclave HV-25	HMC
Thermomixer comfort	Eppendorf
Rotationsverdampfer	Büchi

3. Enzyme

Verwendete Enzyme wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und mit den für jedes Enzym entsprechendem Puffer eingesetzt. Inkubationszeit und Inkubations-temperatur wurden wie vom Hersteller empfohlen gewählt.

Lysozym	AppliChem
Desoxyribonuklease (DNase)	Thermo Scientific
Phusion DNA Polymerase	Laboreigene Polymerase
KOD DNA Polymerase	Merck Millipore
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma-Aldrich
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific / NEB

4. Oligonukleotide

Oligonukleotide die in dieser Arbeit genutzt wurden, wurden alle bei der Firma biomers.net GmbH bestellt. Alle Primer wurden so verdünnt, dass sie eine Konzentration von 100 pmol/µl besaßen.

4.1 Oligonukleotide für die Klonierung der Molybdopterin-oxidoreduktasen

Die Molybdopterin-haltigen Oxidoreduktasen bzw. die Formiatdehydrogenase (Mpox; ähnlich zur Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus*) aus *D. oleovorans* wurden in einen *broad host range* Vektor (pASG-wt1-MOB) kloniert. Der fett gedruckte Teil der Sequenz zeigt die Restriktionsschnittstelle. „fw“ bedeutet forward und „rev“ reverse, die Sequenzen sind von 5´-3´Richtung dargestellt.

Mpox1_BamHI_fw

AAAG**GGATCC**ATGCCTTTAGAAAAAAAAACACGTCG

Mpox1_KpnI_rev

AAAG**GTACCT**CAAAGAGATGAAAATATCGGCATTACCC

Mpox2_BamHI_fw

AAAG**GGATCC**ATGGCAACCACAAAGGTAAAACC

Mpox2_KpnI_rev

AAAG**GTACC**CTATCGGGGCGCCATCTTTTCCAGC

Mpox3_BamHI_fw

AAAG**GATCC**ATGCAAAAACCCATTACGCGGTCTGC

Mpox3_KpnI_rev

AAAG**GTACC**TCATAGGTTCCCTTTTAATTGTTCAAC

Mpox4_BamHI_fw

AAAG**GATCC**ATGACAAACACCATCGGTGACCTGG

Mpox4_Sall_rev

AAAG**TCGAC**CTAGGCTTTTTCCAGAACCACGGCG

Sequenzierungsprimer

Mpox_fw (für alle Mpox Klone)

AAACACAGGAAACAGCTATGACC

Mpox_rev (für alle Mpox Klone)

AAACAGGGTTTTCCCAGTCACGA

Mpox2_Seq_fw (speziell zur Sequenzierung von Mpox2 Klonen)

AAACGGATAACAATTTACACAGGAAACAG

Mpox2_mitte_rev (speziell zur Sequenzierung von Mpox2 Klonen)

ACCTTGATCAGGGGCGTGGT

5. Vektoren

Tabelle 3 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren einschließlich ihrer Besonderheiten. Die Vektoren wurden bei -20 °C gelagert.

Tab. 3: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Vektorname	Genotyp	Referenz
pEntry	KanR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH (Göttingen)
pCFUSE	AmpR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH (Göttingen)
pNFUSE	AmpR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH (Göttingen)
pASG-wt1	AmpR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH (Göttingen)
pASG-IBA3	AmpR, <i>lacZ</i> , Strep-taq für C-terminale Fusion, Tetra-cyklin Promoter	IBA GmbH (Göttingen)
pASG-IBA5	AmpR, <i>lacZ</i> , Strep-taq für N-terminale Fusion, Tetra-cyklin Promoter	IBA GmbH (Göttingen)
pASG-IBA23	AmpR, <i>lacZ</i> , GST-taq für N-terminale Fusion, Strep-taq für C-terminale Fusion	IBA GmbH (Göttingen)
pASG-IBA25	AmpR, <i>lacZ</i> , GST-taq für C-terminale Fusion, Step-taq für N-terminale Fusion	IBA GmbH (Göttingen)
pASG-wt1-MOB	AmpR, <i>lacZ</i>	IBA GmbH (Göttingen)
pUC18	AmpR, <i>lacZ</i>	ThermoFisher Scientific

Sämtliche Vektorkarten wurden mit dem Programm pDraw (AcaClone Software) erstellt.

6. Chemikalien und Gase

Verwendete Chemikalien wurden i.d.R. in bestmöglicher Qualität von folgenden Herstellern bezogen: Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Alfa Aesar (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), Fluka (Buchs). Gase wurden von den Firmen Air Liquide (Düsseldorf) und Praxair (Düsseldorf) geliefert.

7. Mikrobiologische Methoden

7.1 Kultivierung von *Desulfococcus oleovorans* und *Desulfatibacillum alkenivorans*

D. oleovorans und *D. alkenivorans* wurden in Mineralsalzmedium mit 1 mM Hexadecan, Hexadecen, 1-Hexadecanol, 2-Hexadecanol oder Hexadecanoat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle bei 28 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden in 1 l bis 2 l Schott oder Müller-Krempel Flaschen mit entsprechendem Gummistopfen kultiviert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2-6 Monaten. Da es sich bei den beiden Stämmen um Sulfat reduzierende Bakterien handelt, konnte das Wachstum anhand gebildeten Sulfids nachgewiesen werden. Als Methode wurde dabei die kolorimetrische Sulfidbestimmung (Cline, 1969) genutzt (siehe Seite 58). Die Ernte der Kulturen erfolgte je

nach weiterem Verwendungszweck unter aeroben oder anaeroben Bedingungen (SORVALL RC 5B plus, SLA-3000 Rotor, 10000 upm für 30 min bei 4 °C). Die Menge der geernteten Biomasse (Feuchtgewicht) lag je nach verwendetem Stamm, Substrat und Dauer der Inkubation zwischen 50 mg und 300 mg. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -20 °C.

Mineralsalzmedium (pH 7,2) für *D. oleovorans* und *D. alkenivorans*

KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
NaCl	20,0 g/l
NH ₄ Cl	0,25 g/l
Na ₂ SO ₄	4,0 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	3,0 g/l
CaCl ₂ x H ₂ O	0,15 g/l
KCl	0,5 g/l
Resazurin	1,0 mg/l

Die Mineralsalze und das Resazurin wurden in ein Becherglas eingewogen, in destilliertem Wasser gelöst und mit diesem auf 1 l aufgefüllt. 800 ml bzw. 900 ml wurden in eine Schraubdeckelflasche, die mit einem Gummistopfen und einem Schraubdeckel mit Loch verschlossen werden konnte, gefüllt. Die Flaschen wurden unter Verwendung einer Spritze mit einer Vakuum Pumpe verbunden und unter Rühren bzw. Schütteln für ca. 2 h entgast. Danach wurde das Medium mit einem Gasgemisch aus Stickstoff und Kohlenstoffdioxid in einem Verhältnis von 80:20 (Stickstoff:Kohlenstoffdioxid) begast und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit den entsprechenden Komplementierungslösungen (s.u.) supplementiert. Das Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) wurde bei Bedarf mit Hilfe eines Filters (0,2 µm, Filtropur S, Sarstedt, Nümbrecht) und einer Spritze steril in das Medium gegeben. Um den pH-Wert einzustellen wurden zunächst 5 ml steril aus dem Medium entnommen und unter Verwendung des pH-Meters (MAGV GmbH, Laborgeräte-Laborbedarf, Rabenau-Londorf) überprüft, um diesen ggf. mit 1 M H₂SO₄ Lösung auf den richtigen Wert von 7,2 ± 0,2 einzustellen. Vor der Inokulation wurde 2-3 Tage gewartet, damit das Substrat sich bestmöglich im Medium verteilen konnte.

Komplementierungslösungen: (zur Komplementierung von 1 l Mineralsalzmedium)

Spurenelementlösung SL-10 (1000 x)	1,0 ml
Vitaminlösung VL-7 (1000 x)	1,0 ml
Selenit/Wolframat Lösung (1000 x)	1,0 ml
NaHCO ₃ (1 M)	30,0 ml
Na ₂ S x 9 H ₂ O (48 g/l)	7,5 ml
Na ₂ S ₂ O ₄ (5 % frisch ansetzen)	600 µl

Vitaminlösung VI-7 (1000 x)

D(+)-Biotin	20,0 mg
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	100,0 mg
p-Aminobenzoessäure	80,0 mg
Nikotinsäure	200,0 mg
Calcium Pantothenat	100,0 mg
Thiamin-HCl x 2 H ₂ O	200,0 mg
Pyridoxin-HCl	300,0 mg
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen

Nachdem sich die Vitamine im Wasser gelöst hatten, wurde die Lösung mit Hilfe einer Spritze in eine sterile Schraubdeckelflasche, die mit einem Gummistopfen und Schraubdeckel mit Loch verschlossen werden konnte, filtriert (0,2 µm Filter). Danach wurde die Vitaminlösung unter Rühren bzw. Schütteln anaerobisiert, durch entsprechendes Entgasen und Begasen mit Stickstoff. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Spurenelementlösung (SL-10, 1000 x)

HCl (25 %, 7,7 M)	10,0 ml
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	3,0 g
ZnCl ₂	70,0 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100,0 mg
H ₃ BO ₃	6,0 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190,0 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2,0 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,0 mg
Na ₂ MoO ₄	36,0 mg
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen

Zuerst wurde das FeCl₂ in HCl gelöst und mit etwas Wasser verdünnt, dann wurden die restlichen Salze dazugegeben und ebenfalls gelöst. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Lösung auf 90 °C erhitzt. Die Anaerobisierung erfolgte wie bei der Vitaminlösung durch Entgasen und Begasen mit Stickstoff.

Selenium/Wolframat Lösung (1000 x)

NaOH	400,0 mg
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	6,0 mg
NaWO ₄ x 2 H ₂ O	8,0 mg
dH ₂ O	auf 1000 ml auffüllen

Zunächst wurde das NaOH in Wasser gelöst um eine alkalische Lösung zu erhalten, dann wurden die Salze zugegeben. Nachdem sich alles gelöst hatte, wurde auf 1 l aufgefüllt und die Lösung wie bereits vorher beschrieben anaerobisiert und autoklaviert.

Natriumhydrogencarbonat Lösung (1 M)

Das NaHCO_3 wurde in destilliertem Wasser gelöst und mit Stickstoff durchspült. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

$\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$

48 g $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst, anaerobisiert und anschließend autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ wurde in eine Seumflasche eingewogen, ins Anaerobenzelt eingeschleust und in 20 ml anaeroben, destilliertem Wasser gelöst. Im Zelt wurde die Serumflasche mit einem Gummistopfen und einer Bördelekappe (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verschlossen. Im Dunkeln konnte es 2-3 Wochen aufbewahrt werden.

Substrate

Fettsäuren:

Eine äquimolare Menge an Fettsäure und NaOH wurden gemischt, um das Natriumsalz der Fettsäure zu erhalten. Das Salz wurde erhitzt bis es sich verflüssigte und anschließend mit Stickstoff durchspült und autoklaviert.

Alkane, Alkene, Alkohole:

Die verwendeten langkettigen Alkane, Alkene, Alkohole wurden kurz entgast und mit Stickstoff begast und anschließend autoklaviert.

7.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E.coli wurde schüttelnd in sterilem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C angezogen. Bei der Überproduktion von dem EBDH-ähnlichen Enzym wurde ebenfalls M9ZB-Medium verwendet. Entsprechend den vorhandenen Antibiotikaresistenzen wurden dem Medium Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt. TYEGP-Medium wurde ebenfalls bei der Überproduktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* verwendet.

Luria-Bertani (LB)-Medium/Agar pH 7 (Miller, 1972)

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar-Agar	14 g/l

M9ZB-Medium

Trypton	10 g/l
Na ₂ HPO ₄	15 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l

Die Salze wurden in ca. 900 ml dH₂O gelöst, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt. Das Medium wurde anschließend anaerobisiert und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Vor Benutzung wurden noch folgende Zusätze unter sterilen Bedingungen hinzugegeben (einzelnen Komponenten wurden zuvor autoklaviert bzw. sterilfiltriert):

- SL10
- VL7
- SeWo-Lösung
- 1 mM Na₂MoO₄ x 2H₂O
- 0,5 mM Fe(III)Citrat
- 2,5 mM L-cystein
- 50 mM Na-Fumarat
- 1/100 Volumen Glucose
- 1/500 Volumen 1 M MgSO₄
- 1/10000 Volumen 1 M CaCl₂
- Selektionsantibiotikum

TYEGP-Medium pH 6,8

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	10,9 g/l
KH ₂ PO ₄	5,3 g/l

Nach dem autoklavieren wurden noch folgende Supplemente dazugegeben.

40 % Na-Nitrat	25 ml/l (1:40)
100 mM Na ₂ MoO ₄	10 ml/l (1:100)
50 mM Fe(III)citrat	10 ml/l (1:100)
250 mM L-Cystein	10 ml/l (1:100)
20 % Glucose	10 ml/l (1:100)

entsprechendes Antibiotikum

7.3 Kultivierung von *Pseudomonas stutzeri* Stamm K

Pseudomonas stutzeri Stamm K wurde auf Mineralsalzmedium mit 2-Hexadecanol als Substrat (oder anderen zu testenden Substraten) und Nitrat als Elektronenakzeptor angezogen. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 28 °C unter leichtem schütteln. Ein bis zweimal pro Woche wurde der pH-Wert, der Nitratgehalt und die noch vorhandene Menge des Substrates überprüft und ggf. mit 2 M NaNO₃ oder dem entsprechenden Substrat nachgefüttert bzw. der pH mit 6 M HCl wieder eingestellt.

Mineralsalzmedium für *Pseudomonas*

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
NH ₄ Cl	0,3 g/l
CaCl ₂ x H ₂ O	0,1 g/l

Komplementierungslösungen: (zur Komplementierung von 1 l Mineralsalzmedium)

Vitaminlösung	1,0 ml
Spurenelementlösung	1,0 ml
Natriumcarbonatlösung	30,0 ml

Vitaminlösung (1000 x)

siehe Vitaminlösung Sulfatreduzierer Seite 34

Spurenelementlösung (1000 x)

Na ₂ -EDTA	5,2 mg/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,1 g/l
H ₃ BO ₃	30 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	29 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	144 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg/l

Die Spurenelemente wurden in etwas Wasser gelöst, mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und anschließend auf 1 Liter aufgefüllt.

Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 M)

siehe oben

7.4 Isolierung eines Streptomycin resistenten *Pseudomonas stutzeri* Stamm K

Drei 5 ml sterile Kulturröhrchen mit LB-Medium wurden mit einer geringen Konzentration an Streptomycin (4 µg/ml) versetzt. Die Röhrchen wurden mit 100 µl einer gut wachsenden *P. stutzeri* Stamm K Kultur angeimpft. Es wurde mit einer relativ hohen Menge angeimpft, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein Klon dabei ist, welcher Streptomycin tolerieren kann. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C auf dem Rotationsinkubator. Von einer der angewachsenen Kulturen ausgehend, wurde die Konzentration schrittweise bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml Streptomycin erhöht. Aus der Kultur wurde eine Probe steril entnommen und auf einer LB-Agarplatte mit 50 µg/ml Streptomycin ausplattiert, um zu überprüfen, ob es sich noch um eine Reinkultur handelte. Nachdem das bestätigt wurde, konnte eine gewachsene Flüssigkultur aliquotiert, mit 10 % Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren werden.

7.5 Anzucht von *Pseudomonas* im Fermenter

Die Anzucht von *Pseudomonas* im 30 l-Fermenter (Biostat D-DCU) erfolgte mit dem Mineralsalzmedium für *Pseudomonas* (siehe Seite 37). 26 Liter supplementiertes Medium mit 1 mM 1-Hexadecanol als Substrat wurden mit einem Liter Vorkultur (Inkubationszeit der Vorkultur 30 Tage) angeimpft. Der pH-Wert von 7,0 wurde bei Bedarf automatisch mit 6 M HCl nachgestellt. Die Fermentationstemperatur betrug 28 °C und die Drehzahl der Rührwerks 75 upm. Die Begasung erfolgte mit Stickstoff und dabei wurde ein Gasdruck von 100 mbar

gehalten. Es wurde manuell gefüttert, sowohl das Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor, als auch das Substrat. Nachdem das 1-Hexadecanol verbraucht war, wurde 2-Hexadecanol als Substrat eingesetzt, da vermutet wurde, dass bei Wachstum auf diesem Substrat eine Alkoholdehydrogenase in den Zellen induziert wird. Die Ausbeute lag nach ca. 10 Wochen Inkubation bei 21 g. Geerntet wurde mit einer Durchlaufzentrifuge (Padberg). Die Zellen wurden von der Folie abgekratzt und bei -80 °C gelagert.

8. Molekularbiologische Methoden

8.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Inoue et al., 1990)

[DH5α, Top10, JM109, FM420]

Lösungen

→ steriles DMSO

→ SOB-Medium

Trypton	2 % (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM steriles MgCl_2 und 10 mM steriles MgSO_4 dazugegeben.

→ TB-Puffer

Pipes	10 mM
CaCl_2	15 mM
KCl	250 mM

Der Puffer wurde mit KOH auf einen pH-Wert von 6,7 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde sterilfiltriertes MnCl_2 dazugegeben, so dass die Endkonzentration im Puffer 55 mM betrug.

Durchführung

Es wurde eine 5 ml LB Übernachtskultur mit einer *E.coli* Kultur beimpft. Die Hauptkultur mit SOB-Medium wurde auf eine OD von 0,1 angeimpft und im Schüttler bei 250 upm, und 18 °C bis zu einer OD_{578} von 0,4 angezogen. Um das Wachstum zu beenden wurde die Kultur für 10 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5000 upm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde wiederum für 10 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation

bei 5000 upm und 4 °C, für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wiederum in 5 ml eiskalten TB-Puffer resuspendiert. Zusätzlich wurden 350 µl steriles DMSO dazugegeben und vorsichtig gemischt. Inkubiert wurde für 10 min auf Eis und danach konnte die Bakteriensuspension in 100 µl Portionen aliquotiert werden. Die Aliquots wurden sofort unter Verwendung von flüssigem Stickstoff eingefroren, die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

8.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Lösungen

→ dYT-Medium

Trypton 16 g/l

Hefeextrakt 10 g/l

NaCl 5,0 g/l

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7 eingestellt.

→ dH₂O

→ 10 % Glycerin

Durchführung

100 ml dYT-Medium wurden mit einer *E. coli* üN Kultur auf OD₅₇₈ 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C auf dem Schüttler, bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4. Die Kultur wurde anschließend in zwei vorgekühlte, sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Beenden des Wachstums wurde die Kultur 30 min im Eisbad inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 3000 upm, bei 4 °C, für 10 min. Das Medium wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Es wurde wiederum bei 3000 upm, 4 °C, 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml auf Eis vorgekühlten 10 % Glycerin aufgenommen, resuspendiert und erneut für 5 min, 5000 upm, 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt erfolgte noch ein weiteres Mal, wobei das Pellet in 0,5 ml 10 % Glycerin resuspendiert wurde. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl 10 % Glycerin aufgenommen und als 50 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

8.3 Herstellung elektrokompetenter *P. stutzeri* Zellen

Eine 5 ml LB-Kultur wurde mit einer Kolonie angeimpft und bei 28 °C über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag, wurden die Zelle mit 5000 upm, bei 4 °C, für 5 min abzentrifugiert (Sorvall). Die Zellen wurden mindestens 5-mal mit kaltem 10 % Glycerin gewaschen, wobei die Zentrifugation für 10 min, 5000 upm und 4 °C erfolgte. Nach dem letzten Waschschrift

wurde das Pellet in 500 µl 10 % Glycerin aufgenommen und in 100 µl Portionen aliquotiert. Die Zellen wurden direkt verwendet bzw. in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C eingefroren. Die eingefrorenen Zellen verloren relativ schnell ihre Kompetenz und wurden für jeden Versuch frisch hergestellt, wobei die eingefrorenen Zellen als Ausgangsmaterial dienten.

8.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen verwendet. Die Calciumchlorid kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid-DNA dazu pipettiert. Für 30 min wurde der Ansatz auf Eis inkubiert. Der Hitzeshock erfolgte bei 42 °C für ca. 60 sec und anschließend der Ansatz mit den Zellen kurz auf Eis gestellt. Es erfolgte eine Zugabe von 300 µl sterilem LB Medium und eine einstündige Inkubation unter schütteln bei 37 °C im Thermoblock. Abschließend wurden die Zellen auf LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

8.5 Transformation von elektrokompetente Zellen

1 µl Plasmid-DNA bzw. 5 µl eines Ligationsansatzes wurden zu dem aufgetauten Aliquot mit den elektrokompetenten Zellen gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (peqlab) überführt und in den Gene pulser (Programm Ec2) gestellt und die Transformation unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Widerstand	200 Ω
Kapazität	25 µF
Spannung	2,5 kV

Anschließend wurden 200 µl LB-Medium hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. Der Ansatz wurde auf einer LB-Agar Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und üN bei 28 °C (*P. stutzeri*) oder 37 °C (*E. coli*) inkubiert.

8.6 Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Für die Überexpression von Proteinen in den *E. coli* Stämmen JM109, FM420 und DH5α wurde LB-, M9ZB- oder TYEGP-Medium verwendet. Zunächst wurde das gewünschte Plasmid in *E. coli* transformiert (siehe Seite 41). Am darauf folgenden Tag wurde eine 5 bis 10 ml Übernachtskultur mit einer Kolonie angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD₅₇₈ bestimmt und die Hauptkultur auf eine OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,5, wobei Na-

Fumarat bzw. Na-Nitrat als Elektronenakzeptor diente. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0,2 µg/ml Anhydrotetracyklin (AHT), wobei sowohl kurz vor und kurz nach der Induktion eine Probe entnommen wurde. Bei Verwendung von M9ZB-Medium wurde vor der Induktion noch 100 µM Na-Nitrat zur Kultur hinzu pipettiert. Bei Raumtemperatur wurden die Kulturen weiter inkubiert. Weitere Proben wurden alle ein bis zwei Stunden nach der Induktion genommen (ca. 6 h lang) und eine weitere am nächsten Tag. Zu jedem Zeitpunkt wurde die OD₅₇₈ gemessen. Die Proben wurden abzentrifugiert (Sorvall RC 5B plus, SLA-3000 Rotor bei 4 °C, 7000 upm für 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren, um es später mit SDS-Probenpuffer zu versetzen und auf ein SDS-Gel aufzutragen.

8.7 Isolierung genomischer DNA aus *D. oleovorans* und *D. alkenivorans*

Lösungen

→ SET-Puffer (pH 7,6)

Tris/HCl 0,9 g

EDTA 2,79 g

Die Salze wurden in etwas Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl eingestellt und anschließend auf 50 ml aufgefüllt und autoklaviert. 100 ml einer 30 % Saccharose Lösung wurde sterilfiltriert und der autoklavierten Lösung nach abkühlen hinzugegeben.

→ TE-Puffer (pH 8,0)

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

→ 10 % SDS

→ Proteinase K (1 mg/ml)

→ 6 M NaCl-Lösung

→ Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

→ Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

→ RNase-Lösung (10 mg/ml)

10 mg RNase wurden in 1 ml autoklaviertem Wasser gelöst und 15 min im Thermoblock bei 95 °C gekocht. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C weggefroren.

Durchführung

Die Zellen einer wachsenden Kultur wurden abzentrifugiert (Sorvall RC 5B plus; Universal 320 R, MICRO STAR 17) und in einem Milliliter SET-Puffer resuspendiert. Zu dem Ansatz wurden 0,1 Vol. 10 % SDS hinzu gegeben und durch invertieren gemischt. Ebenfalls wurden 0,1 Vol. Proteinase K dazugegeben und gleichermaßen durch invertieren gemischt. Bei

55 °C wurde der Ansatz für minimal 2 h inkubiert und hin und wieder vermengt. Danach wurde 1/3 Vol. 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Durch die Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol werden Proteine ausgefällt. Der Ansatz wurde dafür 30 min geschwenkt (Rotationsinkubator bei Raumtemperatur). Die Zentrifugiert erfolgte für 10 min bei 4 °C und 5000 upm. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde mit Chloroform/ Isoamyl-alkohol erneut extrahiert und wiederum die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 20 µl der RNase-Lösung wurden zu dem Ansatz hinzugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit 1,3 Vol. kaltem Isopropanol (-20 °C) wurde der Reaktionsansatz durch invertieren gemischt. Die ausgefallene DNA wurde 10 min bei 13000 upm abzentrifugiert (MICRO STAR 17, VWR). Das Isopropanol wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert. Das Ethanol wurde vorsichtig entfernt und das DNA-Pellet getrocknet (Speedvakuum-Zentrifuge oder im Thermoblock bei 55 °C). Die Resuspension der DNA erfolgte in TE-Puffer und die weitere Lagerung bei 4 °C.

8.8 Vervielfältigung von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgte durch Verwendung genomischer DNA aus *Desulfococcus oleovorans* als Matrize. Es wurde je nach zu amplifizierendem DNA-Fragment verschiedene Polymerasen (Phusion, KOD, KAPA, Q5) eingesetzt. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der Primer und die Elongationszeit (72 °C) in jedem Zyklus analog der Länge des PCR-Fragmentes (30 s = 1kb) angepasst. Die abschließende Elongationszeit betrug in der Regel 5 min. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 98 °C für 3 min. Die Denaturierung in jedem Zyklus fand dahingegen nur für 30 sec. statt. Die Anzahl der gewählten Zyklen variierte je nach Fragmentlänge zwischen 20 und 35 (je länger das Fragment desto weniger Zyklen, um die Fehlerrate der Polymerase möglichst gering zu halten).

Programm (Beispiel)

Initiale Denaturierung	98 °C	3 min
Denaturierung	98 °C	10 sec
Primer Anlagerung	60 °C	20 sec
Elongation	72 °C	1 min 30 sec
Finale Elongation	72 °C	5 min
Lagerungstemperatur bis zur Entnahme der Proben	10 °C	

8.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration der DNA zu bestimmen, wurde diese in dem Spektrophotometer ND-1000 von Nano Drop vermessen. Dazu wurde 1 µl der gelösten DNA auf den Sensor gebracht und die Absorption bei 230, 260 und 280 nm vermessen (Einstellungen: Nucleic acids, Sample Type DNA-50). Anhand der Absorptionswerte konnte die Software des Gerätes die Nukleinsäurekonzentration berechnen.

8.10 Auftrennung der DNA durch Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der DNA erfolgte nach Sambrook (2001) in Gelen mit 1 % (w/v) Agrose in Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TAE-Puffer). Es wurde pro Geltasche entsprechend der weiteren Verwendung zwischen 3 und 30 µl aufgetragen, welche zuvor in einem geeigneten Volumen 6x Probenpuffer (ThermoFisher Scientific) aufgenommen wurden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in der Regel bei einer Spannung von 120 V für 30 bis 60 min. Bei präoperativen Gelen wurde die Spannung auf 60 V reduziert, wobei der Lauf auch über Nacht bei 4 °C erfolgen konnte. Als Längenstandard wurde der Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific) mit einer Konzentration von 0,5 µg/µl verwendet. Die Agarosegele wurden zum Anfärben der DNA für mindestens 10 min im Ethidiumbromidbad inkubiert.

TAE-Puffer (50 x)

Tris	242 g/l
Essigsäure 100 %	57 ml
EDTA	50 mM

Vor Verwendung wurden 20 ml des 50-fach konzentrierten Puffers mit 980 ml deionisiertem Wasser versetzt um einen einfach konzentrierten Puffer zu erhalten.

DNA Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob die entsprechende DNA-Sequenz nach der Amplifizierung bzw. Ligation fehlerfrei vorlag, wurde diese zum Sequenzieren an die Firma SeqLab geschickt. Insgesamt wurde ein 15 µl Ansatz benötigt, der 1,2 µg der DNA (auch weniger möglich) und je 2 µl des forward und reverse Primers enthalten musste. Um einen 15 µl Gesamtansatz zu erhalten, wurde bei Bedarf mit autoklaviertem dH₂O aufgefüllt. Zur Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung wurde die Software von Multalin (Multiple sequence alignment by Florence Corpet) verwendet.

8.11 Klassische Klonierung

Das PCR-Produkt und der Vektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, wobei die Inkubation, für mindestens 1 h bei 37 °C erfolgte. Bei Verwendung von Fast Digest Enzyme verkürzte sich die Inkubationszeit auf ca. 30-40 min. Nach der Inkubation wurden ca. 3 µl des präoperativen Verdau auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob der Verdau richtig funktioniert hatte und die entsprechenden DNA-Fragmente mit der richtigen Größe vorhanden waren. War dies der Fall, konnte der Ansatz mit dem GeneJET PCR Purification Kit von ThermoFisher Scientific aufgereinigt werden. Bei Bedarf wurde auch der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen, das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt und die entsprechende Bande nach kurzer Ansicht unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Machery Nagel aufgereinigt. Die Ligation erfolgte wenn möglich in einem 10 µl Ansatz mit folgender Zusammensetzung:

x µl Insert

x µl Vektor

1,75 µl ATP

1 µl T4 DNA Ligase Puffer

0,5 µl T4 DNA Ligase

zu 10 µl mit dH₂O auffüllen

Die Konzentration der einzusetzenden Menge an Vektor und Insert wurde genau berechnet.

Formel zur Berechnung der einzusetzenden Menge an Insert und Vektor:

$$m_{\text{DNA}} \text{ (ng)} = MW_{\text{DNA}} \text{ (kDa)} \times \text{einzusetzende DNA-Menge (pmol)}$$

$$\text{mit } MW_{\text{DNA}} \text{ (kDa)} = 660 \times \text{Länge}_{\text{DNA}} \text{ (kb)}$$

0,07 pmol Vektor (10 µl Ansatz)

0,35 pmol Insert (10 µl Ansatz)

Das Verhältnis von Vektor zu Insert sollte im Ligationsansatz immer annähernd 1:5 betragen.

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte für 2 h bis 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C (HPLC Raum). Die Ligation (5 µl) konnte anschließend für die Transformation in elektrokompente oder chemisch kompetente Zellen verwendet werden.

8.12 Restriktionsverdau

10 µl Ansatz:

DNA	100 ng
Enzym	0,5 µl
Puffer (10x)	1,0 µl
H ₂ O	auf 10 µl auffüllen

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für eine Stunde. Bei Fast Digest Enzymen wurde die Inkubationszeit auf 30-40 min reduziert. Der Verdau wurde anschließend mit 1 µl DNA-Ladepuffer (10x) versetzt und auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob der Verdau und somit auch die Ligation bzw. Amplifikation funktioniert hatte.

DNA-Ladepuffer (10 x)

Glycerin	3,9 ml
10 % SDS	500 µl
0,5 M EDTA	200 µl
Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025 g
H ₂ O	auf 10 ml auffüllen

8.13 Klonierung Alkanhydroxylase-Komplex aus *D. oleovorans*

Nachdem zahlreiche PCR Versuche zur Amplifizierung der DNA des Alkanhydroxylase-Komplexes (Accession Nummern WP_012173620 bis WP_012173629) zu keinem positiven Ergebnis geführt hatten, trotz Teilung der DNA in zwei bis drei kleinere DNA-Abschnitte, wurde versucht das gesamte DNA-Stück aus der genomischen DNA herauszuschneiden. Dazu wurde möglichst viel der genomischen DNA mit sechs verschiedenen Restriktionsenzymen (HindIII, BfaI, PvuI, Sall, XhoI, AatII) verdaut, um viele kleine DNA-Stücke zu erhalten. Somit sollten nur wenige große Stücke übrig bleiben. Vorrangig das erwünschte 12 kb große DNA-Stück, mit den darauf liegenden Genen, die für die Proteine des Alkanhydroxylase-Komplexes codieren. Der Verdau umfasste einen 200 µl Ansatz, wobei 0,5 µl des jeweiligen Enzyms eingesetzt wurde. Die Inkubationszeit betrug 40-60 min bei 37 °C im Thermoblock. Nach dem Verdau wurde der gesamte Ansatz auf ein 0,5 % Agarosegel aufgetragen und bei 4 °C über Nacht laufen gelassen. Das Agarosegel wurde in einem frisch angesetzten Ethidiumbromidbad gefärbt und die Bande um 12 kb, nach kurzem angucken auf dem UV-Tisch, herausgeschnitten. Durch Zugabe von ca. 2 ml Natrium-Jodid-Lösung (gesättigte Lösung) wurde das Gel bei 40 °C im Wasserbad gelöst. Zu dem Ansatz wurden 15 µl Glasmilch gegeben und 15 min auf Eis inkubiert, damit die DNA möglichst vollständig an die Glaspartikel binden konnte. Anschließend wurde die Lösung mit der DNA und dem Glasstaub abzentrifugiert bei 5000 upm, Raumtemperatur, für 1min (MICRO STAR 17, VWR). Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Glaspartikel drei Mal mit eiskaltem TES-Puffer gewaschen, wobei zwischendurch immer wieder abzentrifugiert und resuspendiert wurde. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 30-50 µl Wasser, dabei wurde die DNA für 10 min bei 48 °C im Thermoblock inkubiert. Nach der Zentrifugation

wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt, bei 55 °C im Thermoblock getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser resuspendiert.

TES-Puffer

Tris	1,21 g/l
0,5 M EDTA pH 8	2 ml/l
NaCl	5,84 g/l

Alle Komponenten wurden in 480 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 8 eingestellt und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 500 ml Ethanol hinzugegeben.

Der *broad host range* Vektor (pUC18) wurde mit HindIII und AatII geschnitten, auf ein präperatives Agarosegel aufgebracht, im Ethidiumbromidbad gefärbt und die entsprechende Bande (2220 bp) ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Machery Nagel) aufgereinigt. Es wurde eine Ligation angesetzt (siehe Seite 45) und das Plasmid in chemisch kompetente als auch elektrokompente *E. coli* DH5α transformiert. Die Agarplatten auf denen die transformierten Zellen ausplattiert wurden, waren mit Ampicillin und X-Gal zur blau-weiß-Selektion versetzt.

8.14 Klonierung der Acetylenhydratase-ähnlichen Enzyme aus *Desulfococcus oleovorans*

Gene, ähnlich zur Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus* wurden aus dem Genom von *D. oleovorans* ausgewählt (Mpox1 = WP_012176505 vorhergesagte Molybdopterin-haltige Oxidoreduktase; Mpox2 = WP_012173742 vorhergesagte Molybdopterin-haltige Oxidoreduktase; Mpox3 = WP_012174501 vorhergesagte Molybdopterin-haltige Oxidoreduktase und Mpox4 = WP_012174274 vorhergesagte Formiatdehydrogenase) und mittels PCR amplifiziert (Primer siehe Seite 30). Als Schnittstellen für Restriktionsenzyme besaßen Mpox1 – Mpox3 BamHI und KpnI, Mpox4 besaß BamHI und Sall. Das DNA-Stück Mpox1 hatte eine Größe von 2388 bp, Mpox2 2109 bp, Mpox3 2166 bp und Mpox4 1596 bp. Die Genabschnitte wurden in den *broad host range* Vektor pASG-wt1-MOB ligiert (siehe Seite 45), welcher ein Ampicillinresistenzgen aufwies. Die Vektoren wurden in elektrokompente *P. stutzeri* Stamm K transformiert (siehe Seite 41). Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 28 °C inkubiert. Das Wachstum von Kolonien konnte bis zu zwei Tage dauern.

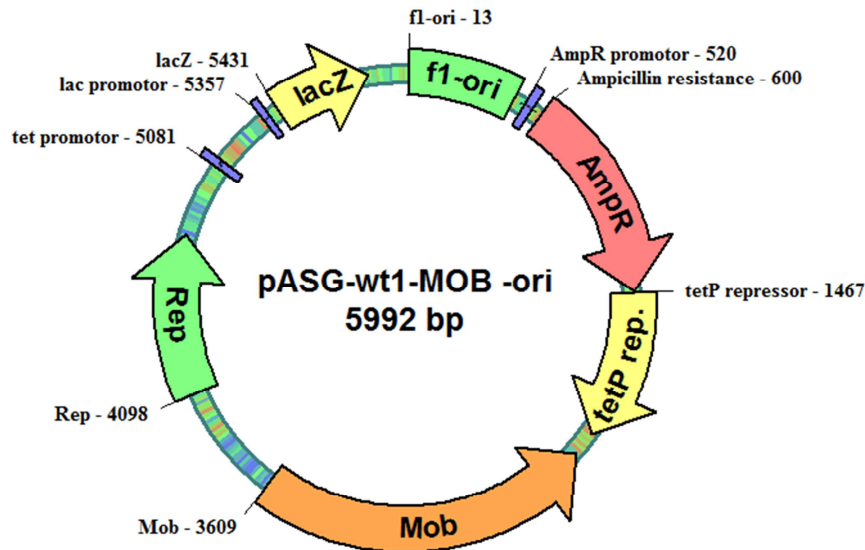
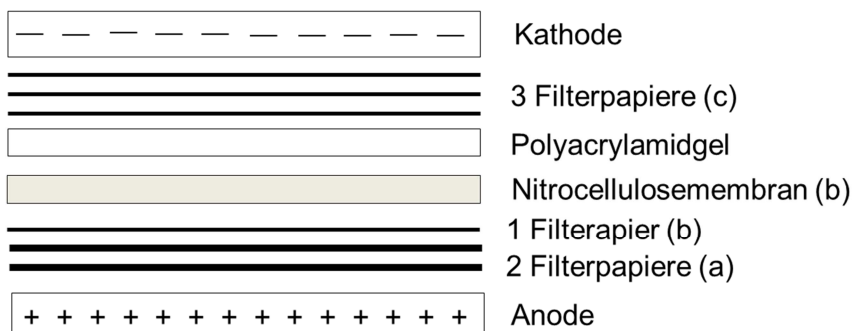


Abb. 3: Vektorkarte des *broad host range* Expressionsplasmids pASG-wt1-MOB. f1-ori: Replikationsursprung des Phagen f1, AmpR: Ampicillinresistenzgen, TetP Rep.: Tetrazyklinrepressorgen, Rep: Repressorgen, TetP: Tetrazyklinpromoter, LacP: Lactosepromoter, AmpRP: Promoter des Ampizillinresistengens, MOB: Mobilisierungsgene

8.15 Färbung von Biotinenzymen auf Western Blots

Ein Polyacrylamidgel mit den auf Biotin zu analysierenden Proteinproben wurde laufen gelassen. Die Proteine aus dem Gel wurden nach dem Semi-Dry Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell von BIO-RAD). Geblottet wurde für 1 h bei einer Stromstärke von 56 mA.

Aufbauschema:



Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran kurz mit Ponceau S angefärbt, um zu überprüfen, ob das Übertragen der Proteine auf die Membran erfolgreich war. Mit TBS wurde das Ponceau S wieder abgewaschen und die Membran für 2 h in Blockierlösung geschwenkt und hinterher für 10 min in TBS gewaschen, um restliches Milchpulver zu entfernen. Darauf

folgte eine Inkubation mit der Avidin-Peroxidase für 1,5 h. Der Waschschrift wurde wiederholt und die Membran drei Mal für jeweils 10 min in TBS gewaschen, zuvor wurde das Gefäß einmal mit TBS ausgespült. Lösung A wurde mit der Lösung B gemischt und die Membran im Dunkeln (Schublade) inkubiert. Wenn die Färbung ausreichend war, wurde die Färbung durch Waschen mit Wasser gestoppt. Die Nitrocellulosemembran wurde eingescannt und anschließend mit Ponceau S gefärbt, um ungefärbte Proteine sichtbar zu machen. Bei Bedarf konnte die Membran dann getrocknet werden.

(a) Anodenpuffer I

Tris 18,15 g

Methanol 100 ml

auf 500 ml mit dH₂O aufgefüllt, zuvor pH 10,4 eingestellt

(b) Anodenpuffer II

Tris 1,52 g

Methanol 100 ml

auf 500 ml mit dH₂O aufgefüllt, zuvor pH 10,4 eingestellt

(c) Kathodenpuffer

6-Aminocapronsäure 2,6 g

Methanol 100 ml

auf 500 ml mit dH₂O aufgefüllt, zuvor pH 7,3 eingestellt

TBS

Tris 2,4 g/l

NaCl 29,2 g/l

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt und die Lösung auf 1 l aufgefüllt.

Blockierlösung

5 g Magermilchpulver wurden in 100 ml TBS gelöst.

Avidin-Peroxidase

Die Avidin-Peroxidase wurde 1:750 (v/v) in TBS verdünnt. Die Lösung wurde bis zu drei Mal wieder verwendet und bei 4 °C aufbewahrt.

Lösung A

Die Lösung A wurde kurz vor Gebrauch frisch angesetzt. 30 mg 4-Chloronaphtol wurden in 10 ml kaltem Methanol gelöst.

Lösung B

Lösung B wurde kurz vor Gebrauch frisch angesetzt. Dazu wurden 30 µl 30 % Wasserstoffperoxid mit 50 ml TBS vermischt.

Ponceau S

Ponceau S	0,1 %
Eisessig	0,5 %
dH ₂ O	auf gewünschtes Volumen auffüllen

8.16 Bindung von Biotinenzymen an Streptavidin beads

Die Beads wurden zunächst drei Mal mit PBS gewaschen. 600 µl einer Probe (lösliche Fraktion eines aufgeschlossenen und abzentrifugierten Zellpellets) wurden zu 50 µl Streptavidin Beads gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur und langsamen schütteln (Rotationsinkubator) inkubiert. Die Beads wurden für 2 min bei 13000 upm abzentrifugiert (MICRO STAR 17, VWR). Der Überstand wurde aufgehoben, um ihn mit auf das SDS-Gel aufzutragen. Die Beads wurden zwei Mal mit Puffer A und zwei Mal mit Puffer B gewaschen (resuspendieren + abzentrifugieren). Anschließend wurden die Beads in 50 µl 5 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95 °C im Thermoblock gekocht. 35 µl davon wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen.

PBS-Puffer (pH 7,4)

1 M K ₂ HPO ₄	80,2 ml
1 M KH ₂ PO ₄	19,8 ml

Puffer A

PBS	10 ml
Tween	0,5 %
SDS	0,05 %

Puffer B

PBS	10 ml
SDS	0,05 %

SDS-Probenpuffer (5 x)

0,5 M Tris/HCl pH 6,8	20 % (v/v)
Glycerin	23 % (v/v)
10 % SDS	40 % (v/v)
β -Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	eine Spatelspitze
dH ₂ O	auf 10 ml auffüllen

9. Biochemische Methoden**9.1 Herstellung von Zellextrakt aus *D. oleovorans* und *D. alkenivorans***

Zu Beginn der Arbeit wurden die Zellen für die SDS-PAGE Analysen aus *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* mit einer Kugelmühle (Mikro-Dismembrator S) aufgeschlossen. Zuvor wurden die Feuchtzellen mit 1 ml Tris/HCl Puffer pH 7,5 gewaschen (resuspendiert und zentrifugiert) und wiederum in 1 ml Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in -80 °C kalten (zuvor kurz in flüssigen Stickstoff inkubiert) Silikongefäße überführt und für 2 min bei 2300 upm in einer Kugelmühle (Mikro-Dismembrator S von B. Braun Biotech International) aufgeschlossen. Der zunächst gefrorene Zellextrakt musste auftauen, um ihn dann in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführen zu können. Da die Effizienz des Aufschlusses mit der Kugelmühle relativ gering war, erfolgte der Aufschluss später mittels Ultraschall. Die geernteten Zellen wurden dabei ebenfalls in 1 ml Tris/HCl Puffer pH 7,5 resuspendiert, DNase und Lysozym hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Aufschluss erfolgte mit dem Sonifier (Sonifier 250 von Branson). Vier Zyklen á 20 Sekunden mit einer Minute Pause dazwischen wurden genutzt. Der Aufschluss erfolgte auf Eis. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und in der Ultrazentrifuge (Sorvall RC-5B plus, Rotor TYP TFT 80.4) für 1 h bei 35000 upm und 4 °C zentrifugiert, wobei Zelltrümmer und Membranproteine sich absetzten und nur die löslichen Proteine im Überstand übrig blieben. Dieser wurde abgenommen und mit 10 % Glycerin bei -20 °C weggefroren bzw. direkt für die SDS-PAGE Analyse genutzt.

9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Proben für eine BSA-Eichgerade (0,1 mg/ml) wurden vorbereitet. Die Eichgerade enthielt Konzentration von 0 - 100 μ g/ml BSA, wobei entsprechend mit Wasser verdünnt wurde.

Pipettierschema:

Konzentration (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
H ₂ O	100 µl	80 µl	60 µl	40 µl	20 µl	-
BSA (0,1 mg/ml)	-	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl

Die unbekannten Proben wurden 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. In eine 96-Well Platte wurden 200 µl Bradford Reagenz (Roti[®]-Quant von Roth), welches zuvor 1:5 mit Wasser verdünnt wurde, vorgelegt. 20 µl der Proben für die Eichgerade und der unbekannten Proben wurde hinzugegeben. Es wurde eine Doppelbestimmung von allen Proben durchgeführt, als Blank-Wert wurde Wasser verwendet. Es wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erfolgte die Vermessung der Proben im ELISA-Reader µQuant (Bio-Tek Instruments Inc.) bei 595 nm. Die Software des Programms berechnete anhand der Absorption die Proteinkonzentration der unbekannten Proben, wobei die Verdünnung noch rausgerechnet werden musste.

Bradford Reagenz:

Coomassie Brilliantblau G	0,001 % (w/v)
Ethanol	4,75 % (v/v)
Phosphorsäure	8,5 % (v/v)

9.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach dem diskontinuierlichen System von Laemmli (1970). Die Proben wurden mit einer entsprechenden Menge an 5 x SDS-Probenpuffer (siehe Seite 51) versehen und für 10 min bei 95 °C im Thermoblock gekocht und anschließend kurz abzentrifugiert. Es wurden pro Tasche 25 µg Protein aufgetragen, durch den Bradford-Test konnte genau ermittelt werden, wie viel µl des Zellextrakts zum Erreichen dieser Konzentration eingesetzt werden mussten. Es wurden Gele von 8-15 % verwendet, je nachdem ob die größeren oder die kleineren Proteine besser aufgetrennt werden sollten. Um einen Überblick des gesamten Proteinmusters zu erhalten, wurde in der Regel ein 12 % Gel genutzt.

Pipettierschema (12 % Gel)

Trenngel:	5,3 ml	dH ₂ O
	6,4 ml	30 % Acrylamid
	4,0 ml	1,0 M Tris pH 8,8
	160 µl	10 % SDS
	160 µl	10 % APS
	16 µl	TEMED

Sammelgel:	5,3 ml	dH ₂ O
	2,0 ml	30 % Acrylamid
	2,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8
	100 µl	10 % SDS
	100 µl	10 % APS
	10 µl	TEMED

SDS-Laufpuffer (1 x)

Tris/HCl pH 6,6	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1 %

9.4 Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Nach der Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in Coomassie-Blue-Färbelösung für mindestens 2 h (zuvor in der Mikrowelle erwärmt) besser über Nacht inkubiert. Bei Polyacrylamidgelen aus denen Proteine für die MALDI-TOF Analyse ausgeschnitten und rückgelöst wurden, erfolgte das Anfärben mit Colloidal-Coomassie, da die Essigsäure die Analyse stören würde. Auch war das Colloidal-Coomassie sensitiver und Proteine die in geringer Konzentration vorlagen wurden besser angefärbt. Ein Kit zur Silberfärbung von Proteinen wurde ebenfalls nach Protokoll vom Hersteller verwendet (Roti®-Black P von Roth).

Coomassie-Färbelösung:

Ethanol	50 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G 250	0,25 % (w/v)

Colloidal-Coomassie

Lösung A: 16 ml Orthophosphorsäure
768 ml dH₂O
80 g Ammoniumsulfat

Lösung B: 1 g Coomassie Brilliant Blue G 250
20 ml dH₂O

16 ml von der Lösung B wurden zu der Lösung A gegeben. Direkt vor Benutzung der Lösung wurden 80 % der Lösung mit 20 % Methanol gemischt.

9.5 Aufkonzentrierung von Proteinen

Um Proben mit geringer Proteinkonzentration aufzukonzentrieren wurden diese mit Trichloressigsäure gefällt. Dazu wurden die Proben mit 1/5 eiskalter Trichloressigsäure (24 %) versetzt und 30 min bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 4 °C und 13000 upm abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 µl 0,5 M NaOH aufgenommen. Durch kurzes Erhitzen im Thermoblock auf 60 °C wurde das Pellet gelöst. Die Proben wurden dann mit einer entsprechenden Menge Probenpuffer versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Eine Ankonzentrierung von Proteinproben mittels VivaSpin Membrankonzentratoren (Vivaspin 2 ml von Sartorius) wurde ebenfalls verwendet. Die Proben wurden in die Membrankonzentratoren gegeben und bei 5000 upm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert (Centrifuge 5403 von Eppendorf). Bei Bedarf wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Die genutzten Membrankonzentratoren hatten eine Aufschlussgrenze von 10 kDa (MWCO).

9.6 Reinigung der Alkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas*

Für die chromatographische Reinigung der Alkoholdehydrogenase wurden die eingefrorenen, aus dem Fermenter gewonnenen (siehe Seite 38), *Pseudomonas* Zellen aufgetaut und in 20 mM Tris/HCl Puffer pH 8 resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mit einer French Pressure Cell Press (American Instruments Company). Zuvor wurden die Zellen bei Raumtemperatur für eine Stunde mit DNase I (0,05 mg/ml) und Lysozym (0,05 mg/ml) inkubiert. Die Zellsuspension wurde in die vorgekühlte (4 °C) French Pressure Zelle gefüllt und durch Anlegen und Absetzen eines Drucks von 137 MPa aufgeschlossen. Der Vorgang wurde bis zu vier Mal wiederholt und der Zellextrakt in der Ultrazentrifuge (Optima L90-K Ultrazentrifuge, Ti-70 Rotor) bei 35000 upm für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Reinigung der Alkoholdehydrogenase verwendet, die durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sepharose erfolgte. Dazu wurde der

Überstand auf eine DEAE Sepharose FastFlow Chromatographiesäule mit einem Säulenvolumen von 60 ml aufgetragen. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen DEAE Grundpuffer äquilibriert und nach dem Auftragen der Probe (ca. 25 ml) mit drei Säulenvolumen DEAE Grundpuffer gewaschen. Es wurde ein linearer Gradient mit bis 100 % B (Elutionspuffer) mit einer Flussrate von 3 ml/min angelegt. Im Fraktionskollektor wurden die Proben der Elution (jeweils 4 ml) gesammelt. Die gesamte Reinigung wurde aerob und bei 4 °C mit einem Äkta FPLC System (Purifire, Agilent Technologies) durchgeführt. Die Alkoholdehydrogenase eluierte bei ca. 20-30 % Lösungsmittel B (Elutionspuffer). Die Fraktionen wurden direkt auf Enzymaktivität getestet (siehe Seite 55) bzw. mit 10 % Glycerin für eine längere Lagerung bei -20 °C eingefroren. Über Nacht konnte die Lagerung auch bei 4 °C erfolgen. Mehrere Fraktionen die alle eine Alkoholdehydrogenase Aktivität aufwiesen wurden vereinigt und ankonzentriert (Ultrafiltration Membranes NWML 10000, Millipore; Amicon 8050).

DEAE Grundpuffer

Tris 2,4 g/l (20 mM)

Der pH wurde mit HCl auf einen Wert von 8 eingestellt.

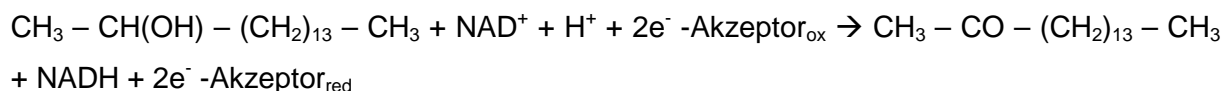
Elutionspuffer

NaCl 58,4 g/l (1 M)

Das NaCl in DEAE Grundpuffer lösen.

9.7 Bestimmung der Enzymaktivität der Alkoholdehydrogenase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Alkoholdehydrogenase von *Pseudomonas stutzeri* Stamm K wurde ein photometrischer Test verwendet. Dabei wurde die Oxidation von Substraten, an die Reduktion eines eingesetzten Elektronenakzeptors gekoppelt. Als Elektronenakzeptor wurde in diesem Enzymtest NAD genutzt. Pro oxidiertes Substratmolekül wurden zwei Elektronenakzeptormoleküle reduziert.



Die Reduktion von NAD^+ wurde bei 365 nm (ϵ 3,4 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) in 1 ml-Plastikküvetten bei 30 °C gemessen. Ein 1 ml Ansatz wurde wie folgt angesetzt:

Pyrophosphat-Puffer	975 μl
Zellextrakt	10 μl
NAD^+	0,24 mM (10 μl bei einer 24 mM Stammlösung)

Die Basislinie des Ansatzes ohne Substrat wurde für ca. 2 min gemessen, bis diese stabil war, dann wurden 500 µl Substrat (z.B. 2-Hexadecanol in tert-Butanol oder DMSO gelöst) dazugegeben und die Reaktion damit gestartet. Die Messung erfolgte am Spektralphotometer Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) mit der Software Cary Win UV Kinetics. Die Temperatur des Photometers wurde durch das Kälte-Umwälzthermostat F25 von Julabo reguliert.

Pyrophosphatpuffer

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	1,3 g/100 ml
Semicarbazid	0,4 g/100 ml

Das Tetranatriumdiphosphat und das Semicarbazid wurden in 80 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 8,7 eingestellt und dann auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Der Puffer war bei 4 °C für etwa 3 Wochen lagerbar.

9.8 Hämfärbung

Die Hämfärbung wurde zum anfärben von Proteinen mit Hämgruppen genutzt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, welches kein β -Mercaptoethanol enthält. Dadurch sollte verhindert werden, dass beim Denaturieren sich die Hämgruppen, durch lösen der Thioesterbindungen, herauslösen. Zu langes aufkochen bei 95 °C wurde ebenfalls vermieden, um keine zusätzlichen Banden auf dem Gel zu erhalten. Teilweise wurde auf das Aufkochen komplett verzichtet. Cytochrom c wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Die Nativgele wurden bei 4 °C mit geringer Spannung (60 V zum Einlaufen, dann 100 V) laufen gelassen. Anschließend wurden diese mit Wasser gewaschen und mit Natrium-Acetatlösung / TMBZ-Lösung in einem Verhältnis von 70:30 versetzt und für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. 500 µl Wasserstoffperoxid (30 %) wurden dazugegeben und der Ansatz weiter im Dunkeln inkubiert. Nach einigen Minuten waren die ersten Banden zu sehen, spätestens aber nach 30 min. Längeres anfärben führte nur zu unspezifischen Banden.

Nativ-Gel

Trenngel (8 %)

H_2O	4,05 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8	5,85 ml
30 % Acrylamid	3,75 ml
10 % APS	238,5 µl
5 % TEMED	163,5 µl

Probenpuffer (4 x)

0,5 M Tris/HCl pH 6,8	6,35 ml
Glycerin	5,0 ml
Bromphenolblau	0,3 mg

Das Gesamtvolumen von 12 ml wurde mit Glycerin aufgefüllt.

Laufpuffer

Tris	3,02 g/l
Glycin	14,4 g/l

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,4 eingestellt und dann mit H₂O aufgefüllt.

Natrium-Acetatlösung (pH 5)

Natrium-Acetat	10,25 g/0,5 l (250 mM)
----------------	------------------------

TMBZ

TMBZ	15 mg/50 ml (1,25 mM)
------	-----------------------

Das TMBZ wurde in einigen Millilitern Methanol gelöst und dann mit Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Da die Lösung sehr lichtempfindlich war, wurde sie stets frisch angesetzt oder maximal für 2-3 Tage im Dunkeln und bei 4 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden 30 ml der TMBZ-Lösung mit 70 ml der Natrium-Acetatlösung gemischt.

9.9 Aktivitätsfärbung (ADH *Pseudomonas*)

Für die Aktivitätsfärbung wurde ein Natives Gel laugen gelassen, welches anschließend kurz mit H₂O gewaschen wurde. Eine ungefähr einstündige Inkubation erfolgte im Anaerobenzelt in einer großen Petrischale mit Pyrophosphatpuffer (siehe Seite 56). Danach wurde der alte Puffer verworfen und frischer Puffer auf das Nativgel gegeben und NAD, Nitroblauterazoliumchlorid (NBT), 5-Methylphenaziniummethylsulfat (PMS) und 2-Hexadecanol als Substrat hinzugegeben. Die Petrischale wurde mit Alufolie abgedunkelt und ca. alle 5 min kontrolliert, ob sich Banden anfärbten. Nach 10-20 min konnte man die gefärbten Banden deutlich erkennen und die weitere Reaktion wurde mit einer Stopplösung unterbrochen. Spätestens nach 30 min sollte eine Färbung zu erkennen sein.

Vorbereitungen

NAD	25 mg in etwas anaerobem H ₂ O gelöst	} für ca. 50 ml Pyrophosphatpuffer
NBT	25 mg in wenig 17 % DMF gelöst	
PMS	2 mg in etwas anaerobem H ₂ O gelöst	

Die Substanzen wurden ins Zelt eingeschleust und das NAD und PMS erst dort in Wasser gelöst.

Stopplösung

Ethanol	50 ml
Essigsäure	20 ml
Glycerin	10 ml
Wasser	40 ml

9.10 Sulfidbestimmung

Die Sulfidbestimmung wurde zur Ermittlung des Wachstums von Sulfat reduzierenden Bakterien (*D. oleovorans* und *D. alkenivorans*) verwendet. Das N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (DMPD) wurde einen Tag vor der Sulfidbestimmung in das Anaerobenzelt eingeschleust und auf den Magnetrührer über Nacht bei angeschraubten Deckel anaerobisiert. 1 ml Probe wurde steril aus den Kulturen mit einer Spritze entnommen und in anaerobisierte, mit 200 µl 5 M Natronlauge versehene, Serumfläschchen überführt. Im Zelt wurden 2 NaOH-Plätzchen in ein 500 ml Messkolben gegeben, ebenso wie 0,6 g $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ (Konzentration in der Lösung 5 mM Sulfid). Das Auffüllen auf das gewünschte Volumen erfolgte mit Wasser. Die Lösung wurde so lange auf dem Magnetrührer stehen gelassen, bis sich die NaOH-Plätzchen vollständig gelöst hatten. Zwölf 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden entsprechend der anzusetzenden Sulfidkonzentrationen beschriftet (0, 10, 25, 50, 100, 250; jeweils in Doppelbestimmung). 5 ml anaerobes Wasser wurde in die Zentrifugenröhrchen vorgelegt und 0 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl der Sulfidstammlösung dazugegeben. Anschließend wurden 400 µl des DMPD hinzu pipettiert und die Ansätze für mindestens 20 min im Zelt inkubiert. Dann wurde die Extinktion photometrisch bei 670 nm bestimmt, wobei Wasser als Referenzwert verwendet wurde. In die Zentrifugenröhrchen, für die zu analysierenden Proben, wurden 400 µl des DMPD vorgelegt und 1 ml der zuvor genommenen Proben hinzugegeben. Nach 20 min wurde die Extinktion bei 670 nm gemessen. Vor der Messung wurden die Proben 1:50, bei älteren Kulturen wo sich bereits viel Sulfid gebildet hatte, 1:100 bis 1:200 verdünnt.

DMPD

Dimethyl-1,4-phenylendiamin	0,5 g
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,75 g

In 25 ml 25 % HCl lösen (zuvor ins Zelt einschleusen).

10. Analytische Methoden

10.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde der unzentrifugierte oder zentrifugierte Überstand (500 ml) einer wachsenden Kultur in einen Scheidetrichter überführt. Ebenfalls wurde ein abzentrifugiertes Pellet in 1 ml Tris/HCl aufgenommen, aufgeschlossen, in der Ultrazentrifuge (Optima L90-K Ultrazentrifuge von Beckman coulter) abzentrifugiert und der Überstand für die Extraktion verwendet. Das halbe Volumen, bezogen auf das Volumen des Ansatzes, an n-Hexan wurde ebenfalls in den Scheidetrichter gegeben und der gesamte Ansatz für 5 min geschüttelt. Anschließend wurde die wässrige Phase von der organischen Phase getrennt und die untere (wässrige) Phase erneut mit den halben Volumen n-Hexan in den Scheidetrichter überführt. Zwei weitere Male (insgesamt drei Mal) wurde der Ansatz für jeweils 5 min geschüttelt und die organische (obere) Phase gesammelt. Zu den gesammelten Lösungsmittel-Phasen der Extrakte wurde wasserfreies Natriumsulfat gegeben, um damit letzte Wasserrückstände zu entfernen. Die Einengung der n-Hexan-Extrakte erfolgte mittels Vakuumrotationsverdampfer (Büchi), bis auf einen Rest von ca. 300 µl – 500 µl. Mit einer Pasteurpipette wurden die restlichen Mikroliter in ein Vial überführt und unter einem Stickstoffstrom bis zur völligen Trocknung eingeengt. Die Proben wurden direkt weiter zur Analyse an das Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung in Leipzig geschickt oder bei 4 °C im Kühlschrank bis zum nächsten Tag gelagert und dann weggeschickt. Die Extraktion der Ansätze ermöglichte es, die Flüssigkeitsmenge soweit zu reduzieren, dass die vorhandenen Substanzen konzentriert vorlagen, was wiederum eine bessere Detektion mittels GC/MS zur Folge hatte.

10.2 Extraktion und Analyse von Lipidfettsäuren

Für die Analyse von Lipidfettsäuren wurden ca. 60 mg (Nassgewicht) der geernteten Zellen benötigt. Diese wurden für die weitere Aufbereitung zum Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ nach Leipzig geschickt. Dort wurden die gesamten Lipide aus den Zellpellets extrahiert, wobei eine abgewandelte Bligh und Dyer Methode zur Lipidextraktion verwendet wurde (Geyer et al., 2005). Die Lipide wurden durch eine milde alkalische Methanolyse zu Fettsäuremethylester (FAMES) umgeestert und in n-Hexan gelöst, welches 20,06 µg mL⁻¹ von 21:0 FAME als internen Standard enthielt (Guckert et al., 1985). Zur Identifikation und Quantifizierung von FAMES wurde ein 7890A Gaschromatograph gekoppelt mit einem 5975C Massenspektrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) genutzt. Ein Mikroliter Probe wurde eingespritzt mit einem Split von 1:3 und einer Injektionstemperatur von 280 °C. Eine chromatographische Auftrennung der FAMES wurde durch die Nutzung einer HP-5ms Säule (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) mit Helium als

Trärgas mit einer Flussrate von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ erreicht. Es folgte ein Temperaturprogramm von $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ als initiale Temperatur die für 1 min gehalten wurde, danach wurde bis $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt mit $20 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, aufheizen bis $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $4 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ und abschließendes aufheizen bis $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $20 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, die für 5 min gehalten wurden. Die Identifikation der Fettsäuren wurde durch den Vergleich der Massenspektren und der Retentionszeit mit Standards für FAMES (BAME Mix, Supelco, Lot:LA85560), massenspektroskopischen Bibliotheken und Massenspektren aus der Literatur (<http://lipidlibrary.aocs.org>) vorgenommen. Die Fettsäuren wurden in der Form A:B bezeichnet, wobei A der Nummer der Kohlenstoffatome entspricht und B die Nummer der Doppelbindungen ist. Der Prefix „10Me“ bezieht sich auf eine Methylgruppe am zehnten Kohlenstoffatom. Die Fettsäuren in jeder Probe wurden quantifiziert als Prozent in Bezug auf die Gesamtheit der Fettsäuren. Die Konzentration jeder Fettsäure wurde anhand der Peakfläche der Fettsäure im Verhältnis zu der Fläche des internen Standards berechnet.

10.3 Identifizierung von Proteinen durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Nach einer Inkubation der Zellen für ca. 4 Monate wurden diese aerob abzentrifugiert (Sorvall centrifuge RC 5B Plus, ThermoScientific) für 30 min bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und 10000 upm. Der Überstand wurde verworfen und in 20 ml 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde wiederum für 30 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 5000 upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in 1 ml 50 mM Tris/HCl Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (Biofuge fresco Heraeus) für 10 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 13000 upm. Das Pellet wurde bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt weiter verwendet. Das Pellet wurde in Tris/HCl Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe Seite 51). Zelllysate wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Seite 52) und die Gele mit Colloidal Coomassie gefärbt. Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte in Kooperation mit dem Bereich Proteinanalytik der Philipps-Universität Marburg. Die zu analysierenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten, entfärbt und im Gel verdaut durch Zugabe von "Sequencing Grade Modified Trypsin" (Promega). Die Inkubation erfolgte bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht. Die Proben wurden in $25 \text{ } \mu\text{l}$ 10 % Acetonitril/ 0,1 % TFA gelöst und für die massenspektrometrische Analyse mittels eines Orbitrap Velos Pro Massenspektrometers (ThermoScientific) genutzt. Ein Ultimate nanoRSLC-HPLC system (Dionex) ausgestattet mit einer Nano C18 RP Säule wurde online mit dem Massenspektrometer durch eine Proxeon Nonospray Quelle verbunden. Sechs Mikroliter des tryptischen Verdaus wurden auf eine C18 Vorkonzentrierungssäule eingespritzt. Automatisches Einfangen und Entsalzen der Probe wurde bei einer Flussrate von $6 \text{ } \mu\text{l/min}$, bei Nutzung von Wasser und 0,05 % Methansäure als Lösungsmittel, durchgeführt. Die Trennung der verdauten Peptide wurde durch Eluieren der Säule mit einem Gradienten aus Wasser/ 0,045 % Methansäure (Lösungsmittel A) und

80 % Acetonitril/ 0,05 % Methansäure (Lösungsmittel B), bei einer Flussrate von 300 µl/min, erreicht. Der Eluent wurde bei 4 % Lösungsmittel B für 5 min gehalten, gefolgt von einem linearen Gradienten bis 45 % Lösungsmittel B in 30 min und einen weiteren linearen Gradienten bis 95 % Lösungsmittel B in 5 min. Die Säule war mit einem nicht rostenden stählernen Nanoemitter (Proxeon, Denmark) verbunden und der Eluent wurde direkt in die aufgeheizte Kapillare des Massenspektrometers eingespritzt, wobei ein Potential von 2300 V genutzt wurde. Ein Überblickscan mit einer Auflösung von 60000 im Orbitrap Massen-Analyseprogramm wurde mit drei Daten abhängigen MS/MS Scans verbunden. Die Daten Analyse wurde durch Verwendung des Proteome Discoverer (ThermoScientific) Suchmaschine mit SEQUEST und MASCOT (Version 2.2; Matrix science) mit Nutzung von SwissProt oder NCBI Datenbanken durchgeführt.

Ergebnisse

1. Wachstum von *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* auf verschiedenen Substraten

D. oleovorans und *D. alkenivorans* sind die mit am besten untersuchten Sulfat reduzierenden Bakterien, die Alkane und Alkene abbauen können. Aufgrund dessen wurden sie für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet. Das Wachstum von *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* wurde auf verschiedenen Substraten untersucht und anhand der Sulfidbestimmung ermittelt (siehe Seite 58). Zum einen sollte sichergestellt werden, dass die Mikroorganismen auch auf den entsprechenden Substraten wuchsen, zum anderen wurde die gewonnene Biomasse für weitere Analysen benötigt. Da es sich bei beiden Bakterienstämmen um Sulfatreduzierer handelte, die Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor nutzten und dabei Sulfat zu Sulfid reduzierten, konnte durch die Konzentration des entstandenen Sulfids auf das Wachstum zurückgeschlossen werden. Durch die Ermittlung der Wachstumskurven wurde gezeigt, dass der Stamm auf dem jeweiligen Substrat wuchs (siehe Abb. 4 und Abb. 5). Durch Kontrollen wurde sichergestellt, dass die Zellen nur das Alkan, das Alken, den iso-Alkohol oder die Fettsäure als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzten und keine anderweitigen Verbindungen vorlagen, die als Substrat verwendet werden können.

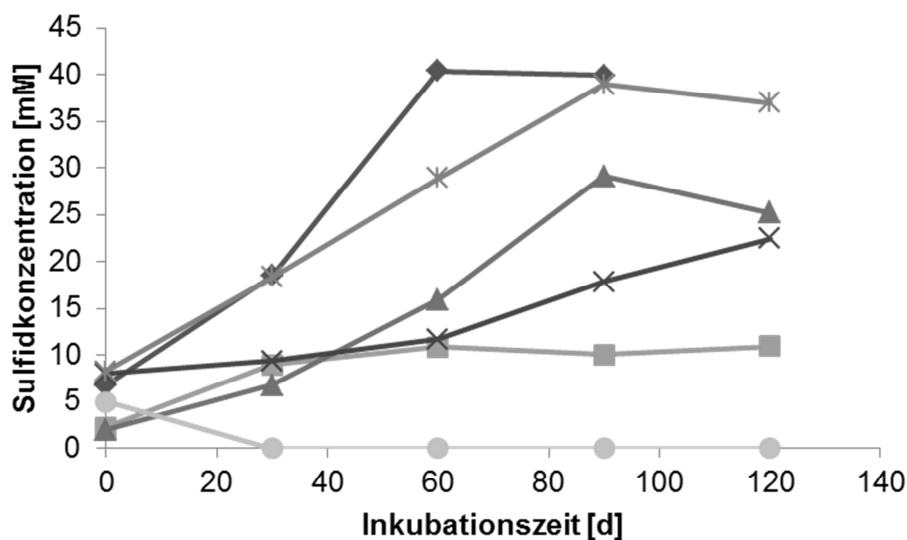


Abb. 4: Wachstum von *Desulfococcus oleovorans* Stamm Hxd3 auf verschiedenen Substraten. Die Wachstumskurve mit Karos als Symbol (◆) zeigt das Wachstum von *D. oleovorans* auf Hexadecanoat, mit Quadraten (■) auf Hexadecan, Dreiecke (▲) auf Hexadecen, x (×) auf 1-Hexadecanol und Sternchen (*) auf 2-Hexadecanol. Die Kurve mit einem Kreis als Symbol (●) zeigt das Wachstum der Kontrolle ohne Substrat.

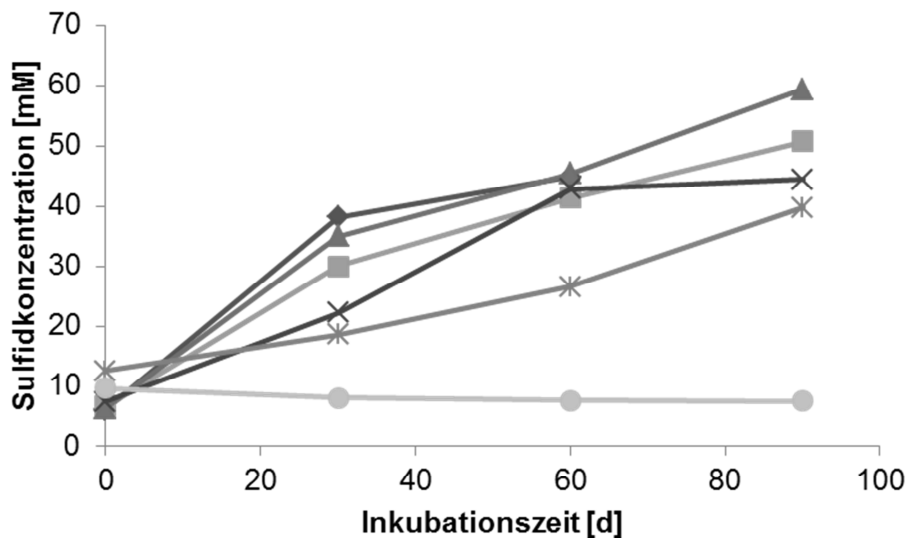


Abb. 5: Wachstum von *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 auf verschiedenen Substraten. Die Wachstumskurve mit Karos als Symbol (◆) zeigt das Wachstum von *D. alkenivorans* auf Hexadecanoat, mit Quadraten (■) auf Hexadecan, Dreiecke (▲) auf Hexadecen, x (×) auf 1-Hexadecanol und Sternchen (*) auf 2-Hexadecanol. Die Kurve mit einem Kreis als Symbol (●) zeigt das Wachstum der Kontrolle ohne Substrat.

Je nach eingesetztem Stamm und Substrat unterschied sich das Wachstum. Die Abb. 4 und Abb. 5 zeigen, dass sowohl *D. oleovorans* als auch *D. alkenivorans* auf allen eingesetzten Substraten wachsen konnten. Die unterschiedlichen Sulfidanfangskonzentrationen kamen dadurch zustande, dass die neuen Kulturen mit 10 % (*D. alkenivorans*) bis 20 % (*D. oleovorans*) der „alten“ Kulturen angeimpft wurden. Je nachdem wie gut die zum Animpfen verwendete Kultur gewachsen war, befand sich entsprechend mehr oder weniger Sulfid darin. Eine entsprechende Menge Sulfid, die mal mehr, mal weniger war, wurde dann durch das Animpfen mittels Spritze in die neue Kultur übertragen. Das beste Wachstum bei *D. oleovorans* wurde auf der Fettsäure Hexadecanoat mit einer Verdopplungszeit von ca. fünf Tagen und auf 2-Hexadecanol mit einer Verdopplungszeit von sieben Tagen erreicht. Bei *D. oleovorans* gewachsen auf 2-Hexadecanol konnte eine Konzentration von bis zu 40 mM Sulfid nachgewiesen werden. Die Zellen auf 1-Hexadecanol (Verdopplungszeit etwa 7,7 Tage) hatten eine etwas längere lag-Phase, was häufig vorkam, aber nicht bei allen angesetzten Kulturen der Fall war. Mit Hexadecan als Substrat konnte Wachstum detektiert werden, aber deutlich geringeres als bei den anderen Substraten. Die Verdopplungszeit auf diesem Substrat war mit etwa 9 Tage die längste und folglich wurde hier stets am wenigsten Biomasse geerntet. Die Zellen, die auf Hexadecen als Substrat wuchsen, benötigten ca. 5,3 Tage um sich zu verdoppeln. Im Vergleich zu *D. oleovorans* wuchs *D. alkenivorans* etwas schneller und auch die nach Zellernte gewonnene Biomasse lag deutlich über der von *D. oleovorans*. Oft war bei diesem Stamm bereits nach 30 Tagen ein deutliches

Wachstum zu erkennen, wobei teilweise die Kulturen auf Hexadecanoat dann geerntet wurden. Die Verdopplungszeit auf Hexadecanoat lag bei ca. 2,4 Tagen. Ähnlich war es auf den Substraten Hexadecan und Hexadecen die eine Verdopplungszeit von 2,6 bzw. 2,8 Tagen aufwiesen. Die Kulturen auf iso-Alkoholen benötigten etwas mehr Zeit für die Verdopplung der Zellzahl (ungefähr 4 Tage bei 1-Hexadecanol und 5 Tage bei 2-Hexadecanol). Allerdings unterschieden sich die Verdopplungszeiten der einzelnen Ansätze mit gleichem Substrat von Batch zu Batch etwas. Die in dieser Arbeit aufgeführten Zeiten entsprechen den Verdopplungszeiten der Kulturen in Abb. 4 und Abb. 5. Dabei spielte es u.a. eine Rolle, wie oft der Stamm bereits überimpft wurde (mit zunehmender Adaption an das Substrat, verringerte sich auch die Verdopplungszeit).

2. Induzierte Proteine

Nach Beendigung des Wachstums wurden die Zellen geerntet (siehe Seite 51), aufgeschlossen und die Proteine ggf. ankonzentriert. Mit der gewonnenen Biomasse wurden verschiedene Analysen durchgeführt. So wurde der Zellextrakt der aufgeschlossenen Zellen auf ein SDS-Gel aufgetragen, um das spezifische Proteinmuster der Zellen auf dem jeweiligen Substrat zu erhalten. Nach Anfärbung mit Colloidal Coomassie wurde dann das SDS-Gel auf induzierte Proteine überprüft. Als induzierte Proteine galten die Proteine, die nur auf dem jeweiligen Substrat zu detektieren waren. Abb. 6 veranschaulicht das Proteinmuster von *D. oleovorans* bei anaerobem Wachstum auf den verschiedenen Substraten.

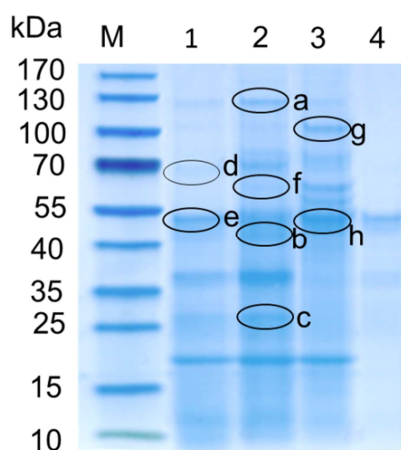


Abb. 6: SDS-PAGE Analyse von *D. oleovorans* auf verschiedenen Substraten. Mit Colloidal Coomassie angefärbtes 12 % Polyacrylamidgel. Die einzelnen Spuren zeigen den Proteinmarker (prestained Protein ladder, Thermo Scientific; M), Zellen gewachsen auf 2-Hexadecanol (1), Hexadecan (2), Hexadecen (3) und Hexadecanoat (4). Banden a-h wurden mittels MALDI-TOF analysiert.

Die Banden a, b und c aus Alkan-abbauenden Zellen von *D. oleovorans* wurden durch MALDI-TOF Analyse als Untereinheiten des Ethylbenzaldehydrogenase ähnlichen Enzymes identifiziert, das im Genom des Stamms bereits aufgefallen war. Die Bande a ist die α -Untereinheit des EBDH-ähnlichen Enzyms mit einer Größe von ca. 114 kDa. Bande b ist die β -Untereinheit der EBDHL mit ungefähr 45 kDa und Bande c die γ -Untereinheit mit ca. 25 kDa. Die Untereinheiten des EBDH-ähnlichen Enzyms konnten nur in Zellen detektiert werden, die auf Hexadecan wuchsen, nicht jedoch in Zellen von *D. oleovorans*, die mit Hexadecen, 2-Hexadecanol oder Hexadecanoat als Substrat gewachsen waren. Bei den anderen induzierten Proteinen handelte es sich hauptsächlich um Enzyme der β -Oxidation (siehe Tab. 4), wobei nicht alle Banden eindeutig einem Enzym aus *D. oleovorans* zugeordnet werden konnten. Bei den Banden im Proteinmuster der Zellen, die auf Hexadecen und 2-Hexadecanol gewachsen waren und anscheinend die gleiche Größe wie die α -Untereinheit der EBDHL aufwiesen, handelt es sich um andere Proteine.

Tab. 4: Mögliche identifizierte Enzyme der MALDI-TOF Analyse von Proteinen aus dem SDS-Gel von *D. oleovorans*.

Bande	identifiziertes Protein nach MALDI-TOF Analyse
a	α -Untereinheit des EBDH-ähnlichen Enzyms
b	β -Untereinheit des EBDH-ähnlichen Enzyms
c	γ -Untereinheit des EBDH-ähnlichen Enzyms
d	Acyl-CoA Dehydrogenase AMP-abhängige Synthetase und Ligase FAD-abhängige Pyridin Nukleotid-disulfid Oxidoreduktase
e	Acetyl-CoA Acetyltransferase ATP-Synthase α -Untereinheit hypothetisches Protein Dole_1025
f	AMP-abhängige Synthetase und Ligase
g	Methylviologen-reduzierende Hydrogenase δ -Untereinheit
h	ATP-Synthase α -Untereinheit Heterodisulfidreduktase Untereinheit A hypothetisches Protein Dole_1025

Die Originaldaten der MALDI-TOF Analyse wurden im Anhang siehe Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14, Tab. 15, Tab. 16 und Tab. 17 aufgelistet.

Auch das Proteinmuster von *D. alkenivorans* wurde auf induzierte Proteine untersucht (Abb. 7), wobei besonders das Proteinmuster von Kulturen auf Hexadecen von Interesse war, um eventuell einen Hinweis auf den anaeroben Abbau von Alkenen von diesem Stamm zu erhalten.

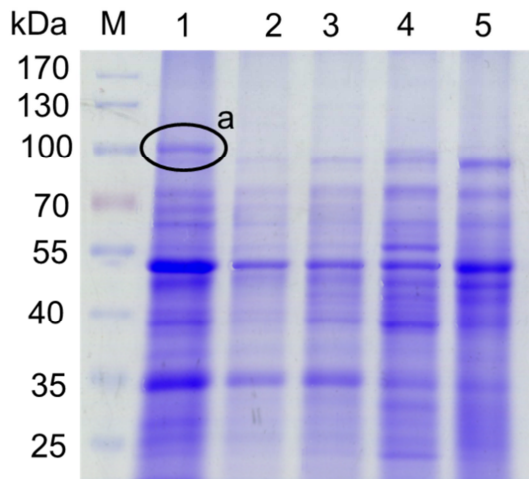


Abb. 7: SDS-PAGE Analyse von *D. alkenivorans* auf verschiedenen Substraten. Mit Coomassie gefärbtes 12 % Polyacrylamidgel. Die einzelnen Spuren zeigen den Proteinmarker (prestained Protein ladder, Thermo Scientific; M), das Proteinmuster der Zellen gewachsen auf Hexadecan (1), Hexadecen (2), 1-Hexadecanol (3), 2-Hexadecanol (4) und Hexadecanoat (5). Alkylsuccinatsynthase (a)

Auf dem SDS-Gel von *D. alkenivorans* nach anaeroben Wachstum auf verschiedenen Substraten sieht man bis auf ein Protein von ca. 100 kDa in Alkan-abbauenden Zellen keine signifikanten Unterschiede. Dieses wurde durch die MALDI-TOF Analyse als Alkylsuccinatsynthase identifiziert, also ein bereits bekanntes Enzym des anaeroben Alkanabbaus via Fumarat-Addition.

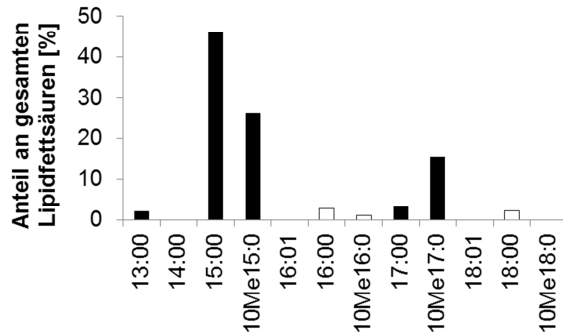
3. Analyse der Fettsäuremuster

3.1 Fettsäuremuster der Zellen bei Wachstum auf Reinsubstrat

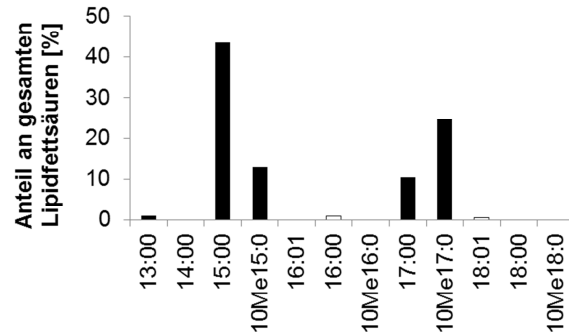
Um weitere Informationen zu den Mechanismen des Alkan- und Alkenabbau zu erhalten, wurde neben dem Proteinmuster auch das Fettsäuremuster der beiden Bakterienstämme auf unterschiedlichen Substraten mittels GC/MS Analyse der extrahierten Fettsäuren (siehe Seite 59) analysiert. Dabei wurde sich die Besonderheit des Stammes *D. oleovorans* bezüglich des Fettsäuremusters zu Nutze gemacht, da der Stamm bei einem Wachstum auf Alkanen mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen hauptsächlich ungeradkettige Fettsäuren bildet und umgekehrt. Bei *D. alkenivorans* entstehen dahingegen bei Wachstum

auf geradkettigen Alkanen auch vorrangig Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen.

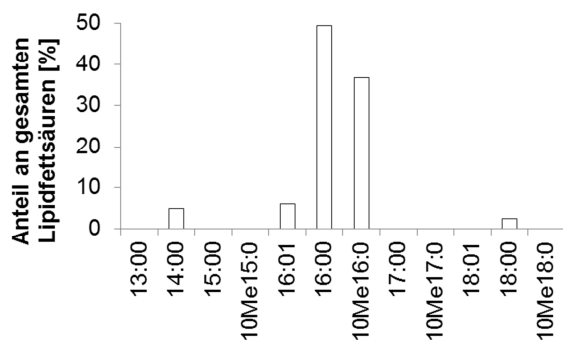
(a) Hexadecan



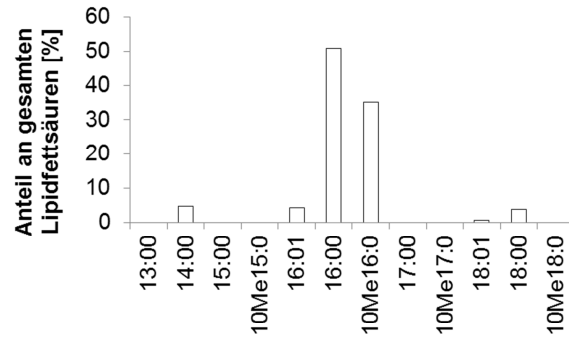
(b) 2-Hexadecanol



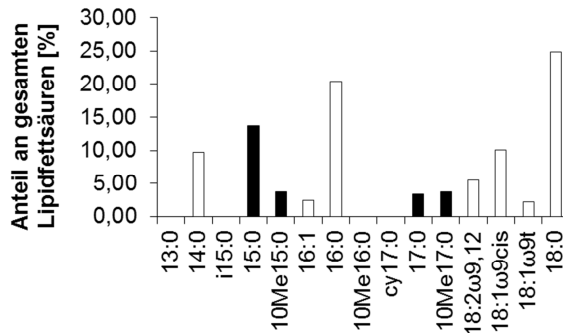
(c) Hexadecen



(d) Hexadecanoat



(e) 2-Tridecanol



(f) Heptadecan

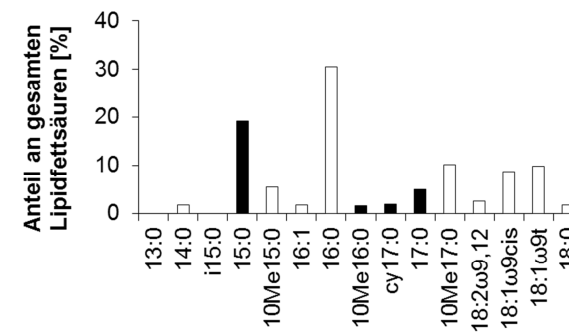


Abb. 8: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in *D. oleovorans* auf verschiedenen Substraten. Fettsäuremuster der Zellen gewachsen auf Hexadecan (a), 2-Hexadecanol (b), Hexadecen (c), Hexadecanoat (d), 2-Tridecanol (e) und Heptadecan (f). Die schwarzen Säulen zeigen ungeradkettige Fettsäuren und die weißen Säulen geradkettige Fettsäuren.

Die Fettsäuremuster von *D. oleovorans* bei Wachstum auf Hexadecan und 2-Hexadecanol, sowie auf Hexadecen und Hexadecanoat waren sehr ähnlich (Abb. 8). Mit Hexadecan und 2-Hexadecanol als Wachstumssubstrat wurden allerdings hauptsächlich Fettsäuren mit ungeradkettigen Kohlenstoffketten detektiert. Bei auf Hexadecan gewachsenen Zellen betrug der Anteil der ungeradkettigen Fettsäuren bezogen auf die Gesamtheit der Lipidfettsäuren

93,3 %. Bei 2-Hexadecanol waren es 92,7 %, wobei bei beiden die 15:0 und 17:0 Fettsäure dominant waren. Bei den Kulturen auf Hexadecen und Hexadecanoat verhielt es sich genau andersherum, dort wurden hauptsächlich Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen gefunden und die Fettsäure 16:0 war dominierend. Ungeradkettige Fettsäuren waren bei diesen beiden Substraten fast nicht vorhanden. Es konnte bestätigt werden, dass bei Wachstum von *D. oleovorans* auf ungeradkettigen Substraten, hauptsächlich geradkettige Fettsäuren entstehen und umgekehrt.

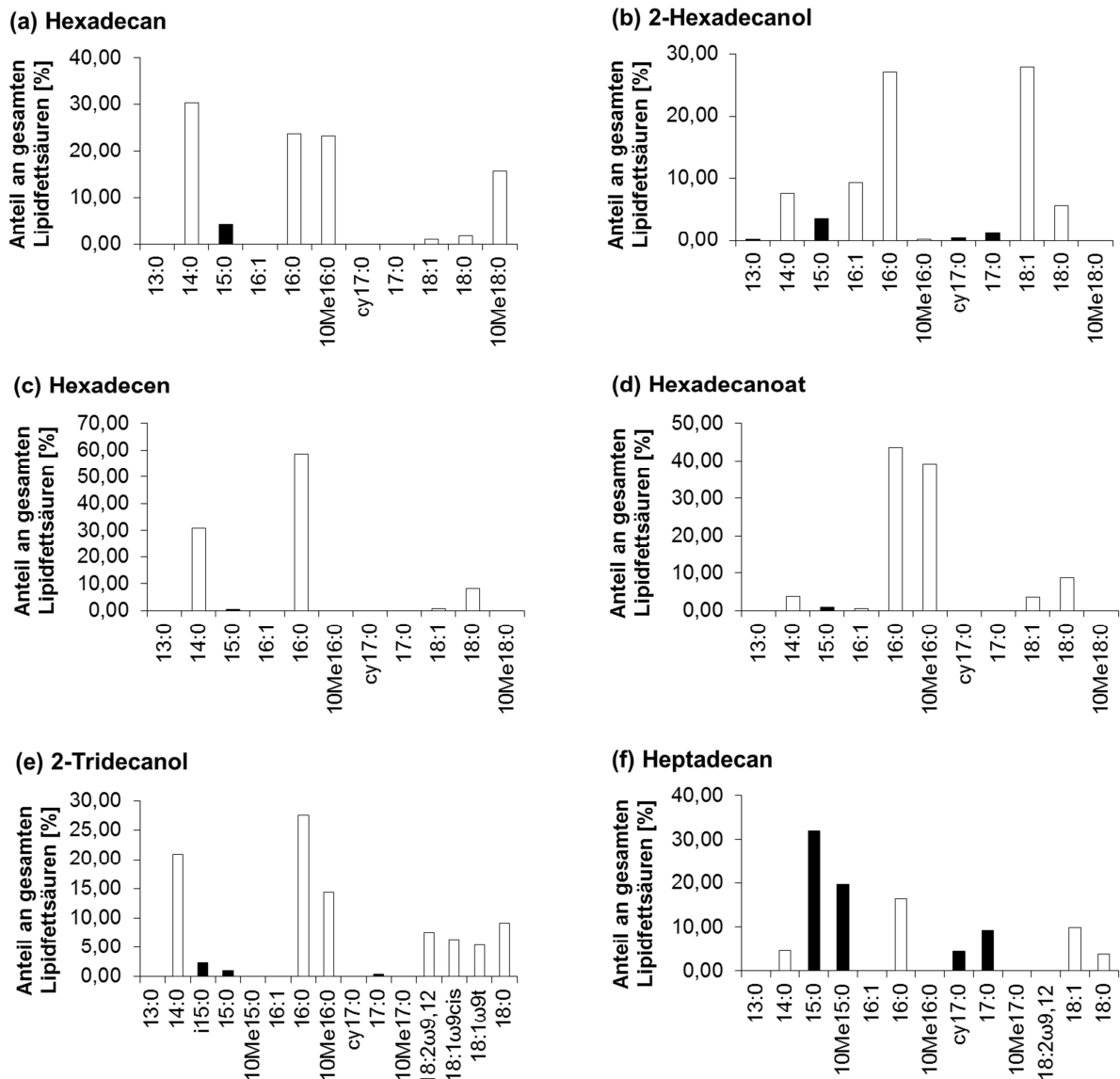


Abb. 9: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in *D. alkenivorans* auf verschiedenen Substraten. Fettsäuremuster der Zellen gewachsen auf Hexadecan (a), 2-Hexadecanol (b), Hexadecen (c), Hexadecanoat (d), 2-Tridecanol (e) und Heptadecan (f). Die schwarzen Säulen zeigen ungeradkettige Fettsäuren und die weißen Säulen geradkettige Fettsäuren.

Die Fettsäureanalyse von *D. alkenivorans* auf Hexadecan, Hexadecen, 2-Hexadeca-nol und Hexadecanoat zeigte hauptsächlich Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette. 95,6 % der gesamten Lipidfettsäuren der Zellen auf Hexadecan waren geradkettig, 94,7 % auf 2-Hexadecanol, 98,4 % auf Hexadecen und 99,1 % auf Hexadecanoat (Abb. 9).

3.2 Fettsäuremuster der Zellen bei Wachstum auf Mischsubstraten

Um zu untersuchen, welche Substrate von den beiden Mikroorganismen bevorzugt werden, wurden Kulturen mit gemischten Substraten in einem bestimmten Verhältnis angesetzt.

Hexadecan und Hexadecen wurden in verschiedenen Mischverhältnissen eingesetzt. Bei Wachstum von *D. oleovorans* mit einem geradkettigen Alkan, sollten ungeradkettige Fettsäuren und bei Wachstum auf einem geradkettigen Alken entsprechend geradkettige Fettsäuren entstehen. Dadurch war es möglich zu unterscheiden, welche Verbindung von dem Stamm zum Wachstum genutzt wurde (siehe Abb. 10).

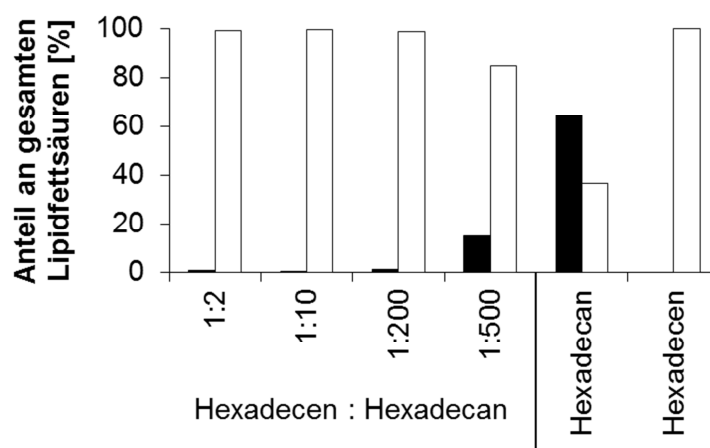


Abb. 10: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in *D. oleovorans* gewachsen auf Hexadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen (1:2, 1:10, 1:200, 1:500). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl.

Anhand von Abb. 10 ist zu erkennen, dass in Anwesenheit von Alkenen bei *D. oleovorans* ein Abbau von Alkanen erst ab einer Verdünnungsstufe von 1 zu 500 (Alken:Alkan) einsetzte. Das zeigt, dass das Alken von dem Stamm *D. oleovorans* deutlich bevorzugt wurde. Das Fettsäuremuster der Zellen auf Hexadecan war hier etwas anders, als das in Abb. 8, da es etwas mehr Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette gibt. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die *D. oleovorans* Hexadecan-

Kultur auch einige Male mit Zellen, die auf einem anderen Substrat wuchsen, angeimpft werden musste, da die Vorgängerkultur auf Hexadecan nicht angewachsen war. Trotzdem waren die ungeradkettigen Fettsäuren immer noch dominierend. Für eine detaillierte Darstellung der einzelnen Fettsäuren siehe Anhang Abb. 31.

Weitere Kulturen wurden mit einem geradkettigen iso-Alkohol und einem ungeradkettigen Alkan als Mischsubstrat angesetzt. Dabei sollte der geradkettige Alkohol überwiegend zu ungeradkettigen Fettsäuren und das ungeradkettige Alkan entsprechend zu geraden Fettsäuren abgebaut werden. Dadurch konnte wiederum unterschieden werden, welches Substrat vorrangig abgebaut wurde (siehe Abb. 11).

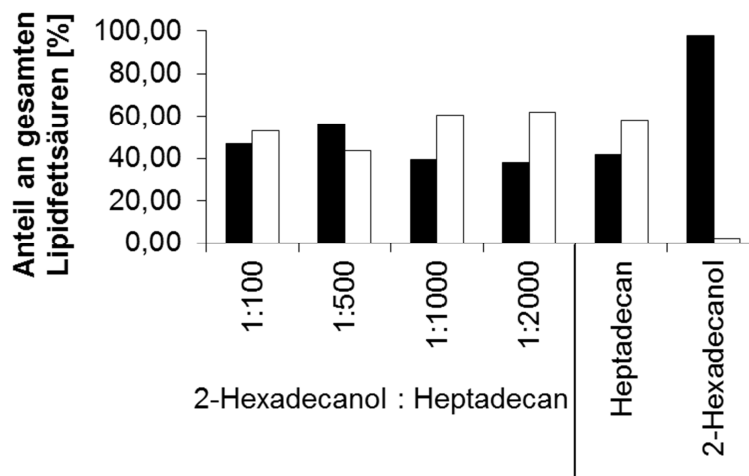


Abb. 11: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in *D. oleovorans* gewachsen auf Heptadecan, 2-Hexadecanol und auf beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen (1:10, 1:500, 1:1000, 1:2000). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl.

In Zellen, welche auf Heptadecan (C_{17}) gewachsen waren, wurden mehr Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette detektiert (Abb. 11). Mit 2-Hexadecanol als Substrat verhielt es sich genau andersherum, ungeradkettige Fettsäuren waren vorrangig vorhanden. Ab einer Verdünnung von 1:1000 (2-Hexadecanol:Heptadecan) konnten mehr geradkettige Fettsäuren als ungeradkettige Fettsäuren detektiert werden, was für einen erhöhten Abbau des Heptadecans spricht. Für eine detaillierte Darstellung der einzelnen Fettsäuren siehe Anhang Abb. 32.

Ein weiterer Wachstumsversuch wurde mit einem ungeradkettigen iso-Alkohol und einem geradkettigen Alkan in einem definierten Mischverhältnissen durchgeführt. Dabei sollte der ungeradkettige Alkohol hauptsächlich zu geradkettigen Fettsäuren und das geradkettige Alkan entsprechend zu ungeraden Fettsäuren abgebaut werden. So konnte auch bei diesem Versuch unterschieden werden, welche Verbindung bevorzugt abgebaut wurde (Abb. 12).

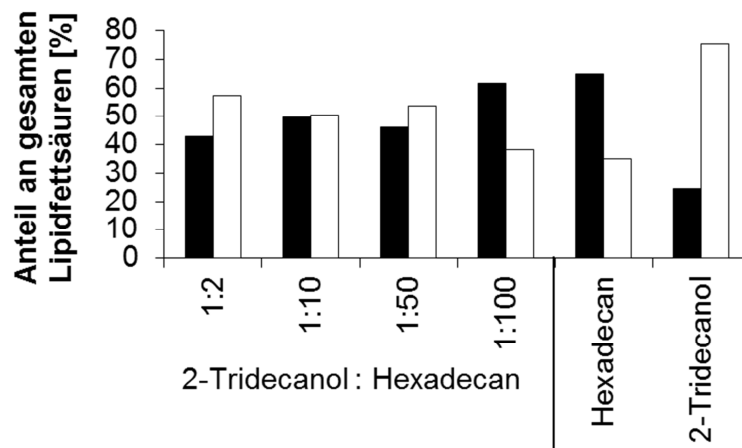


Abb. 12: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in Zellen von *D. oleovorans* gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen (1:2, 1:10, 1:50, 1:100). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl.

Bei einem Wachstum von *D. oleovorans* auf 2-Tridecanol (C_{13}) wurden hauptsächlich Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette detektiert (Abb. 12). In der Verdünnung von 1:2 (2-Tridecanol:Hexadecan) wurden etwas mehr geradkettige Fettsäuren detektiert, was für einen vermehrten Abbau des iso-Alkohols spricht. Bei den Verdünnungen 1:10 und 1:50 wurden geradkettige und ungeradkettige Fettsäuren in einem ähnlichen Verhältnis gefunden. Erst ab einer Verdünnung des iso-Alkohols von 1:100 wurden Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in einem dominierenden Verhältnis zu den geradkettigen Fettsäuren gefunden. Für eine detaillierte Darstellung der einzelnen Fettsäuren siehe Anhang Abb. 33.

Für Kulturen mit *D. alkenivorans* wurden als Substrat ein geradkettiges Alken und ein ungeradkettiges Alkan als Mischsubstrat eingesetzt. Dabei sollte bei diesem Stamm das Hexadecan vorrangig zu geradkettigen Fettsäuren und das Heptadecan entsprechend zu ungeraden Fettsäuren abgebaut werden. Wodurch wiederum eine Unterscheidung im Fettsäuremuster bei Wachstum auf dem jeweiligen Substrat möglich war (Abb. 13).

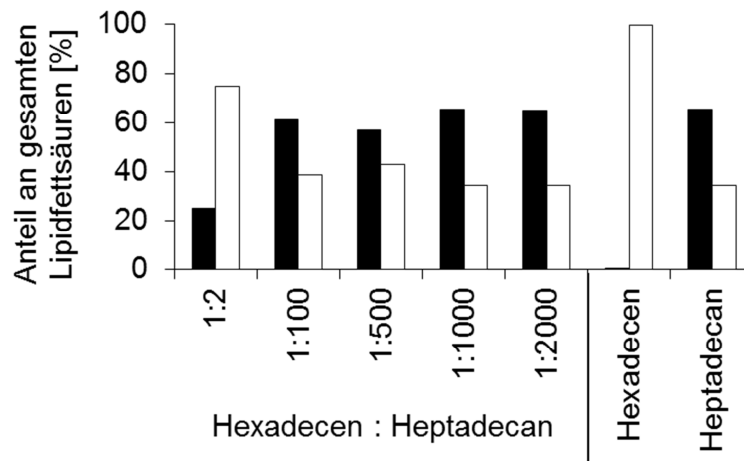


Abb. 13: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in *D. alkenivorans* gewachsen auf Heptadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen (1:2, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoff-anzahl.

Mit *D. alkenivorans* wurden bei einem gleichen Verhältnis von Hexadecen zu Heptadecan mehr Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette detektiert. Bei den anderen Mischverhältnissen waren vorrangig ungeradkettige Fettsäuren vorhanden (Abb. 13). Für eine detaillierte Darstellung der einzelnen Fettsäuren siehe Anhang Abb. 34. Bei einem weiteren Ansatz mit *D. alkenivorans* wurde als Substrat ein geradkettiges Alkan und ein ungeradkettiger iso-Alkohol als Mischsubstrat verwendet. Dabei sollten beim Abbau von Hexadecan hauptsächlich geradkettige Fettsäuren und beim 2-Tridecanol entsprechend ungeradkettige Fettsäuren entstehen.

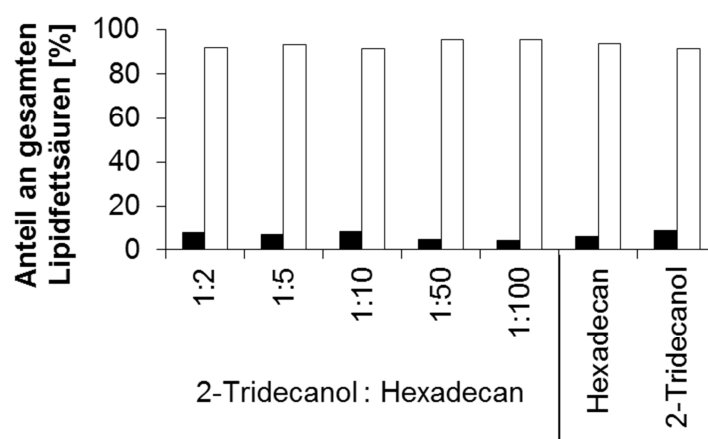


Abb. 14: Relative Häufigkeit der geradkettigen bzw. ungeradkettigen Lipidfettsäuren in *D. alkenivorans* gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen (1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl.

Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse von *D. alkenivorans* auf Hexadecan und 2-Tridecanol verdeutlichen, dass jedoch auf beiden Substraten hauptsächlich Fettsäuren mit einer geraden Zahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette gebildet wurden (Abb. 14). Die detektierten Fettsäuren können also nicht direkt aus dem iso-Alkohol entstanden sein. Für eine detaillierte Darstellung der einzelnen Fettsäuren siehe Anhang Abb. 35.

4. GC/MS-Analyse von Zellextrakten

Bei der Fettsäureanalyse von *D. oleovorans* auf Hexadecan und 2-Hexadecanol konnte gezeigt werden, dass bei Wachstum auf beiden Substraten vorrangig ungeradkettige Fettsäuren entstanden (siehe Abb. 8). Dies könnte darauf hindeuten, dass 2-Hexadecanol ein Abbauprodukt von Hexadecan sein könnte und sollte daher weiter untersucht werden. Dafür wurden 500 ml einer Kultur mit Hexadecan als Substrat extrahiert (siehe Seite 59) und mittels GC/MS analysiert.

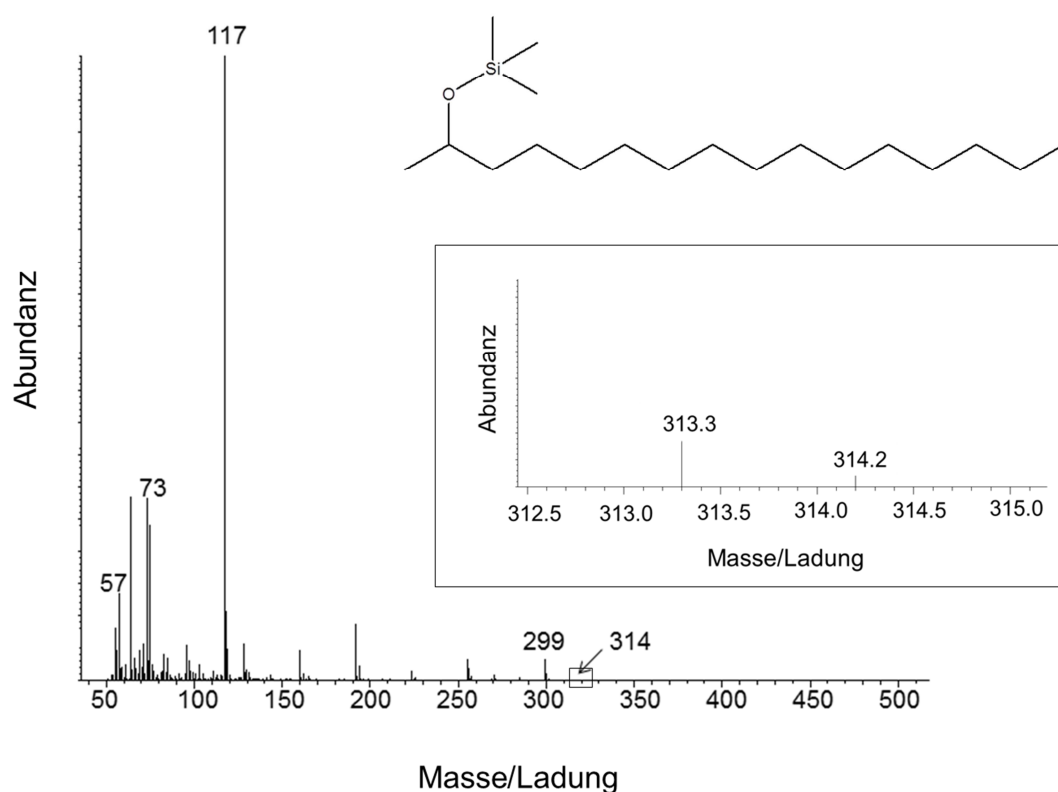


Abb. 15: Massenspektrum von silyliertem 2-Hexadecanol. GC/MS-Analyse des Zellextrakts von *D. oleovorans* auf Hexadecan. Für die Extraktion wurde n-Hexan als Lösungsmittel verwendet.

Der zuvor gewonnene Extrakt (siehe Kapitel 10.1 Seite 59) wurde mit BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid) silyliert. Dabei lagerte sich die Trimethylsilylgruppe an die Hydroxygruppe an, d.h. das Wasserstoffatom wurde abgespalten und durch die Silylgruppe

ersetzt (siehe Abb. 15). Bei dieser Analyse wurden im Überstand von Alkan-abbauenden Zellen tatsächlich geringe Konzentrationen von silyliertem 2-Hexadecanol, welches eine Masse von m/z 314 besitzt, detektiert. Ein 2-Hexadecanol Standard, gelöst in Hexan, wurde ebenfalls mit analysiert, um sicher zu gehen, dass es sich um das gleiche Massenspektrum handelte wie bei unserer Probe (siehe Abb. 16).

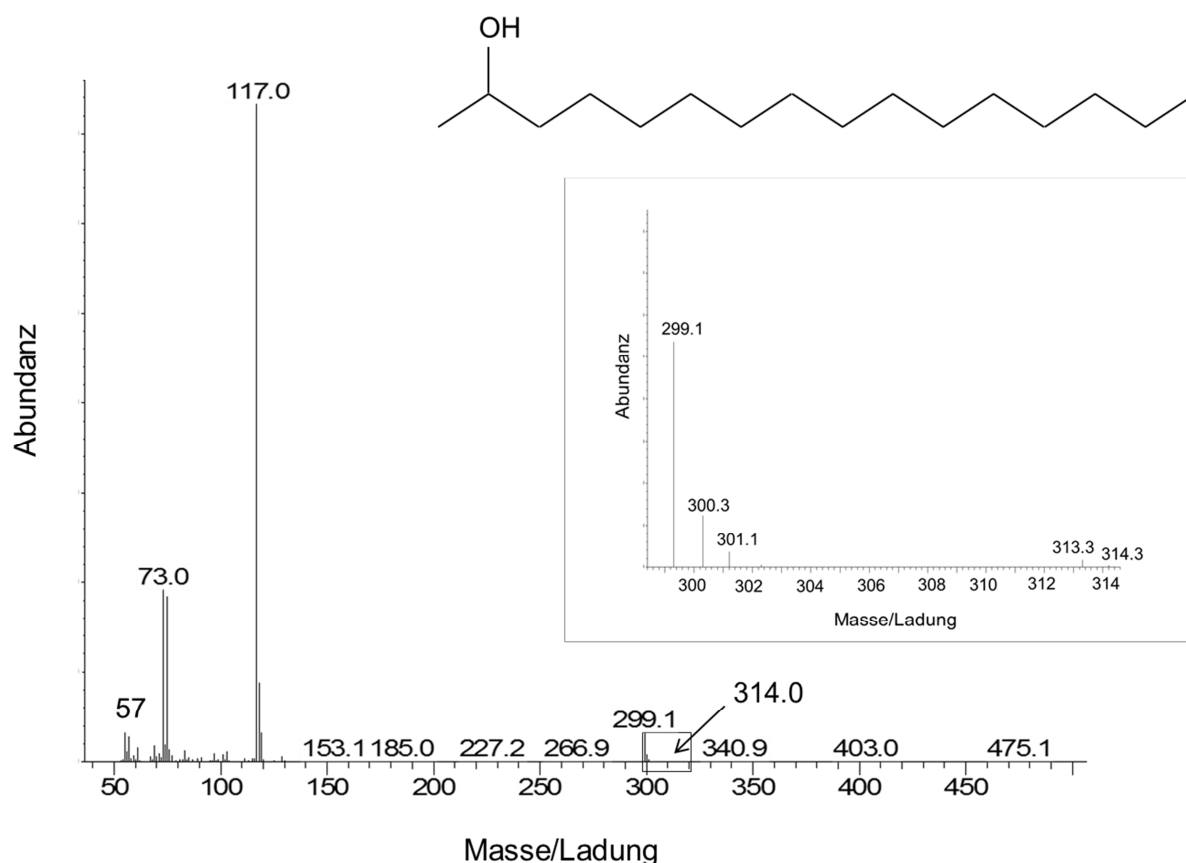


Abb. 16: Massenspektrum von silyliertem 2-Hexadecanol Standard 0,1 mM gelöst in n-Hexan.

Der Peak mit der Masse m/z 314 wies allerdings sowohl in dem Extrakt der Hexadecan-Kultur, als auch beim Standard eine sehr geringe Abundanz auf (siehe Abb. 15 und Abb. 16). Der nächst größere Peak hatte eine Masse von m/z 299 (siehe Abb. 15 und Abb. 16) und weist darauf hin, dass wahrscheinlich ziemlich schnell eine Methylgruppe abgespalten wurde. Somit wäre das Produkt in seinem Ausgangszustand nicht sehr stabil. Bei dem Fragment mit einer Masse von m/z 117 wurde die Kohlenstoffkette auf einer Länge von 14 C-Atomen vom Ende her abgespalten. Die Masse von m/z 73 (siehe Abb. 15 und Abb. 16) deutet auf ein Fragment hin, bei dem die Trimethylsilylgruppe und 12 C-Atome (vom Ende) der Kohlenstoffkette abgespalten wurde. Bei der Masse von m/z 57 (siehe Abb. 15 und

Abb. 16) handelt es sich um ein Fragment, bei dem noch eine Kohlenstoffkette mit 4 C-Atomen vorhanden ist.

In einer Kontrolle mit *D. oleovorans* auf Hexadecen wurde kein Peak bei der gleichen Retentionszeit und der gleichen Molekülmasse detektiert (siehe Abb. 17).

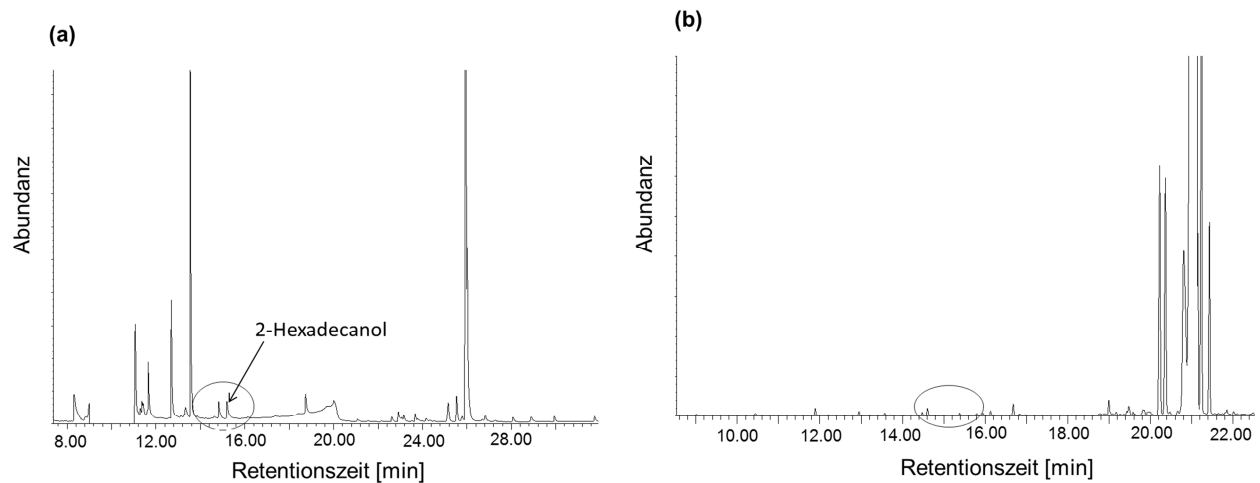


Abb. 17: Vergleich der GC/MS Chromatogramme der extrahierten Proben von *D. oleovorans* gewachsen auf Hexadecan (a) und Hexadecen (b). Als Lösemittel wurde n-Hexan zur Extraktion und zum resuspendieren der Proben verwendet. In dem Chromatogramm a wurde 2-Hexadecanol bei einer Retentionszeit von 15,2 min detektiert. In Chromatogramm b mit Hexadecen als Substrat konnte bei dieser Retentionszeit kein entsprechendes Produkt gefunden werden.

Zusätzliche Metabolite, die weiteren Produkten des in dieser Arbeit postulierten Abbauwegs (siehe Abb. 28) entsprechen, wurden nicht gefunden. Der Peak von 2-Hexadecanol war allerdings bereits so gering, dass nicht erwartet werden konnte, weitere aus dem iso-Alkohol resultierende Abbauprodukte zu finden.

5. Überexpression des EBDH-ähnlichen Enzyms bzw. Klonierung des Alkanhydroxylase-Komplexes

Wie bereits in der Einleitung unter Punkt 6 erwähnt, wird vermutet, dass die Gene aus *D. oleovorans*, die eine relativ hohe Ähnlichkeit zur Ethylbenzaldehydrogenase aus *A. aromaticum* aufweisen, am anaeroben Abbau der Alkane beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Gene in einen Vektor kloniert (Abb. 18), um das Enzym näher charakterisieren zu können.

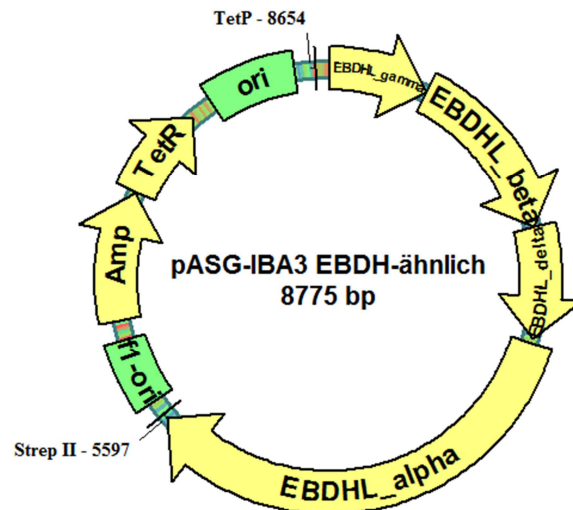


Abb. 18: Vektorkarte des *E. coli* Expressionsplasmids pASG-IBA3 mit den klonierten Untereinheiten des Ethylbenzoldehydrogenase ähnlichen Enzyms. f1-ori: Replikationsursprung des Phagen f1, Amp: Ampicillinresistenzgen, TetR: Tetrazyklinrepressor-gen, ori: Replikationsursprung, TetP: Tetrazyklinpromoter, Strep II: Strep-taq für C-terminale Fusion

Das Expressionsplasmid pASG-IBA3 (Abb. 18) stand für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bereits zur Verfügung, ebenso wie die Expressionsvektoren pASG-IBAw1, pASG-IBA5, pASG-IBA23 und pASG-IBA25 die alle vier Gene für die Untereinheiten des EBDH-ähnlichen Enzyms enthielten. Der Aufbau entsprach dem des pASG-IBA3 Vektors, nur im Tag unterschieden sich die einzelnen Vektoren (siehe Tab. 3). Die Plasmide wurden in die *E. coli* Stämme DH5 α , Top10, JM109 und FM420 transformiert und die Blau-Weiß Selektion zur Identifikation richtiger Klone verwendet. Anschließend wurden jeweils die Gene des rekombinanten Proteins, in M9ZB-Medium (siehe Seite 35) überexprimiert (siehe Seite 41). Bei einer OD₅₇₈ von 0,4 bis 0,5 wurde durch Zugabe von 0,2 μ g/ml Anhydrotetrazyklin induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Zellen abzentrifugiert und das Pellet mit SDS-Probenpuffer bei 95 °C im Thermoblock gekocht, somit wurde die Denaturierung der Proteine erreicht. Pro Tasche wurden 25 μ g Protein aufgetragen (Abb. 19).

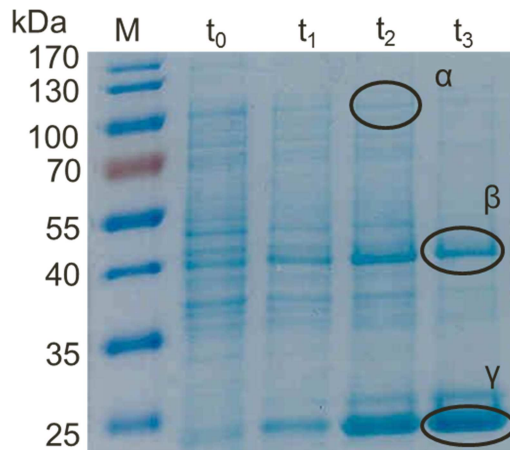


Abb. 19: SDS-PAGE Analyse der Zelllysate aus der Überexpression des Expressionsplasmids (pASG-IBA3 mit den Untereinheiten des EBDH ähnlichen Enzyms) in *E. coli* DH5 α . kDa: Kilodalton, M: Proteinmarker, t_0 : entnommene Probe direkt nach der Induktion, t_1 : 2 h nach der Induktion, t_3 : 4 h nach der Induktion, t_4 : 18 h nach der Induktion, α : α -Untereinheit des EBDHL Enzyms, β : β -Untereinheit des EBDHL Enzyms, γ : γ -Untereinheit des EBDHL Enzyms

Es wurde gezeigt, dass alle Untereinheiten, die das aktive Protein enthält, synthetisiert wurden, wobei aber nur die β - und γ -Untereinheit in großen Mengen vorhanden waren. Bei der α -Untereinheit war es teilweise schwer, diese überhaupt zu erkennen. Die beste Überexpression wurde in den *E. coli* Stämmen JM109 und DH5 α erhalten, unabhängig vom verwendeten Vektor. Bei Betrachtung aller Stämme eignet sich der Vektor pASG-IBAw1 ohne Tag am besten zur Überexpression.

Wegen der geringen Menge der α -Untereinheit, die bei den Expressionsversuchen mit diesem Konstrukt produziert wurde, war eine Umklonierung notwendig. Dabei wurde versucht, die Gene des gesamten potentiellen Alkanhydroxylase-Komplexes in einen Vektor zu klonieren. Also die Untereinheiten des EBDH-ähnlichen Enzyms und die Untereinheiten eines potentiellen Membranenzym-Komplexes, die anscheinend in einem gemeinsamen Operon kodiert sind (siehe Abb. 20). Die Reihenfolge der EBDHL Gene sollte wie natürlich vorkommend, mit der α -Untereinheit beginnen.



Abb. 20: Postulierter Alkanhydroxylase-Komplex mit den entsprechenden Genen. Die Größe des DNA-Abschnitts entspricht 11036 bp.

Zahlreiche Versuche, dieses große Fragment mittels PCR zu amplifizieren führten zu keinem positiven Ergebnis. Dabei wurde auch eine Aufteilung in zwei oder drei kleinere DNA-

Fragmente versucht, aber es wurde keine Polymerase gefunden, die bei diesen großen Fragmenten ein ausreichendes *proof-reading* aufwies. Daher wurde versucht, den Genabschnitt mittels Restriktionsenzymen, die nur an den Flanken schneiden, direkt aus der genomischen DNA herauszuschneiden (siehe Seite 46). Das vorhergesagte DNA-Fragment wäre bei Verwendung der Restriktionsenzyme *Aat*II und *Hind*III, die am dichtesten bei den Genen des Alkanhydroxylase-Komplexes liegen 12021 bp groß. Nach Restriktion der chromosomalen DNA und Reinigung der Fragmente um die 12000 bp wurden diese in den *broad host range* Vektor pASG-wt1-MOB ligiert und in chemisch kompetente bzw. auch elektrokompente *E. coli* DH5 α transformiert. Die Klone wurden durch Blau-Weiß-Screening selektiert und die Plasmide aus den positiven Klonen gereinigt. Mittels Testverdau erfolgte eine erste Überprüfung, ob sich das gesuchte DNA-Fragment in dem Vektor befand. Bis zum Ende dieser Arbeit wurde allerdings kein Klon gefunden, der ein Plasmid mit dem gesamten Genabschnitt für den Alkanhydroxylase-Komplex aufwies.

6. Isolierung und Charakterisierung eines denitrifizierenden Bakteriums, das langkettige Isoalkohole abbaut

Um das 2-Hexadecanol als Metabolit des anaeroben Abbaus von Alkanen durch *D. oleovorans* auch enzymatisch nachweisen zu können, sollte ein Bakterienstamm gefunden werden, der langkettige iso-Alkohole abbauen kann. So wurden Proben aus der Umwelt, genauer aus einem Graben in der Nähe von Marburg (Cappeler Feld), entnommen die offensichtlich mit Öl verschmutzt waren.

30 ml der aus dem Graben entnommenen Probe, wurden zu einem Liter anaeroben Mineralsalzmediums (ursprüngliches Rezept für EbN1) mit 1 mM 2-Hexadecanol als Substrat gegeben. Nitrat wurde dabei als Elektronenakzeptor genutzt. Die Kultivierung erfolgte anaerob bei 28 °C. Es war wichtig für das Wachstum, dass die Kulturflaschen immer leicht geschüttelt wurden, bei einer „Standkultur“ war kein Wachstum erkennbar. Bereits nach einem Tag konnte man erkennen, dass die Probe angewachsen war. Die Kultur wurde viele Male immer wieder anaerob auf Mineralsalzmedium mit dem iso-Alkohol als Substrat überimpft. Einmal pro Woche wurden der pH-Wert, der Nitratgehalt und die noch vorhandene Menge des Substrates überprüft. Nach ca. sechs maligem überimpfen in neues anaerobes Mineralsalzmedium wurde versucht, einzelne Bakterienstämme sowohl aerob als auch anaerob auf Agarplatten zu vereinzeln. Auf LB-Agarplatten wurden sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen eine Vielzahl von Kolonien sichtbar. Verschiedene einzelne Kolonien wurden wiederum in Flüssigmedium gebracht (Mineralsalzmedium mit iso-Alkohol), um auch den Stamm zu isolieren, der für den Abbau des iso-Alkohols verantwortlich war. Nach der erneuten erfolgreichen Kultivierung auf Flüssigmedium mit 2-

Hexadecanol, erfolgte wiederum ein Ausstrich auf LB-Agarplatten, die aerob wie auch anaerob inkubiert wurden. Dies wurde solange wiederholt (ca. fünf Mal), bis eine Reinkultur vorlag, die auf dem iso-Alkohol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnte. Diese Reinkultur wurde ebenfalls noch dreimal aus LB-Agarplatten vereinzelt, um sicher zu sein, dass wirklich keine Verunreinigungen durch andere Bakterienstämme mehr vorlagen. Die Amplifizierung und Sequenzierung der 16S-rDNA des isolierten Stammes und die Auswertung, über einen phylogenetischen Sequenzvergleich ergab, dass es sich dabei um einen neuen *Pseudomonas stutzeri* Stamm handelt. Ein ca. 800 bp großes Fragment der 16S-rDNA Sequenz des isolierten Stammes, wurde dabei mit den entsprechenden Nukleotidsequenzen (Nukleotid Datenbank NCBI) anderer Bakterienstämme verglichen und aus den Daten ein Stammbaum erstellt (siehe Abb. 21). Der Blast von Nukleotidsequenzen (hier 16S-rDNA) zeigt an, inwieweit diese ähnlich zueinander sind. In dem Stammbaum bilden die verschiedenen 16S-rDNA Sequenzen der Bakterienstämme Cluster, in denen Gruppen mit hoher Sequenzidentität zusammengefasst werden. Der selbstisolierte Stamm wurde in der Abb. 21 mit *Pseudomonas stutzeri* Stamm K bezeichnet. Bei den Stämmen, die zusammen mit *P. stutzeri* Stamm K einem Cluster bilden, handelt es sich ebenfalls um weitere *P. stutzeri* Stämme. Das ist ein guter Hinweis dafür, dass es sich bei dem isolierten Stamm um die gleiche Art handelt. Da der Sequenzast des Stammbaumes aber auch noch Vertreter von anderen Arten enthält, z. B. von *Pseudomonas guariconensis*, sollte das Ergebnis der DSMZ zunächst als vorläufig gewertet werden, bis eine eindeutige Klärung der Artzugehörigkeit vorliegt.

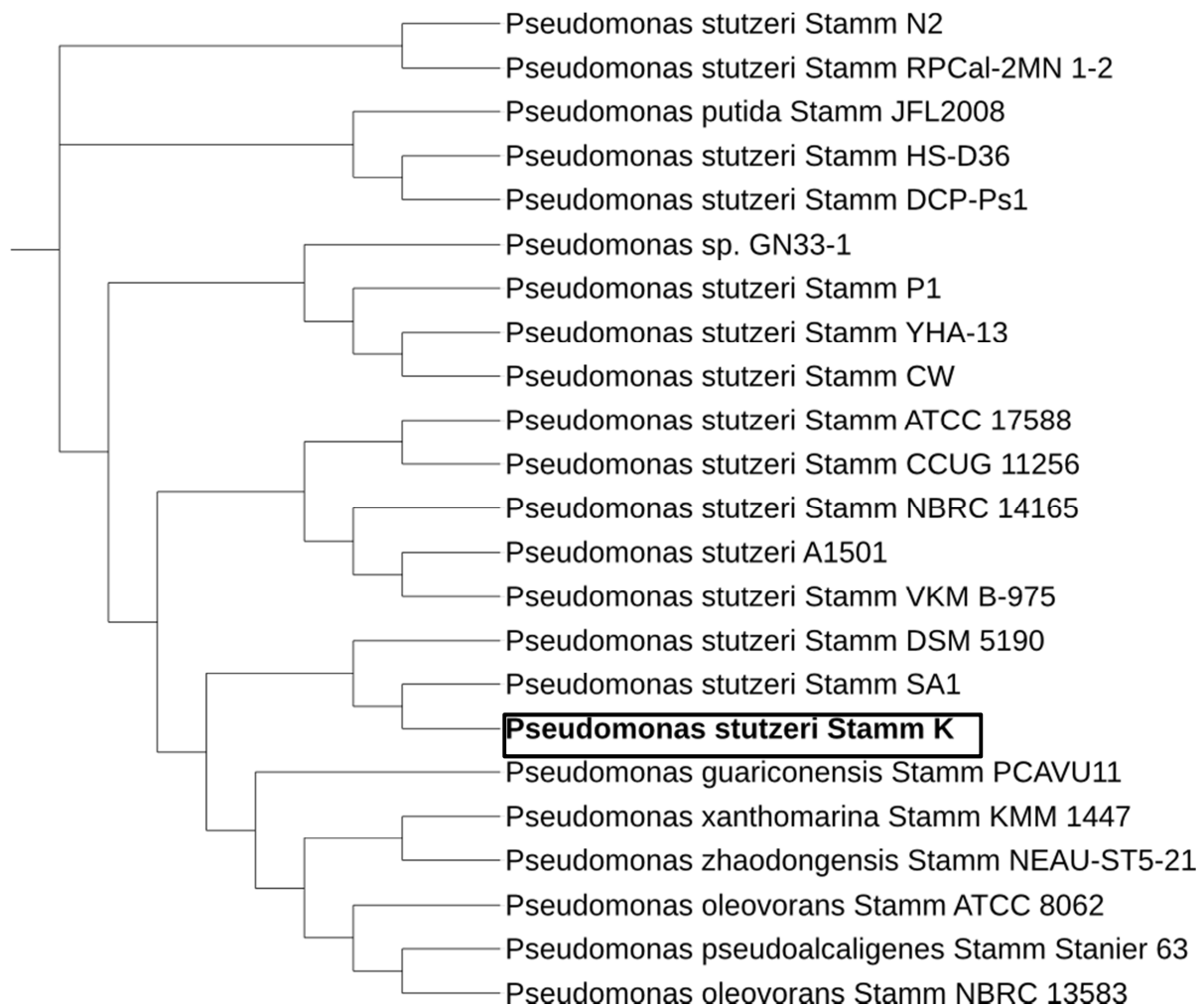


Abb. 21: Phylogenetischer Stammbaum aus dem Vergleich der 16S-rDNA des selbstisolierten Stammes mit der Nukleotidsequenz anderer Bakterienstämme. *P. stutzeri* Stamm K wurde durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet. Die 16S-rDNA Nukleotidsequenzen wurden aus NCBI Datenbankeinträgen entnommen. Das Alignment der Sequenzen wurde mit der Software Clustal Omega (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) durchgeführt. Der Stammbaum wurde mit iTOL (itol.embl.de/) erstellt.

6.1 Identifizierung

Nach der erfolgreichen Vereinzelung eines der isolierten Stämme, die anaerob auf 2-Hexadecanol als alleiniger C-Quelle wachsen konnten, wurde dieser über den Identifizierungs-Service der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) als ein neuer Stamm der Spezies *Pseudomonas stutzeri* identifiziert. Wir benannten diesen Stamm als Stamm K.

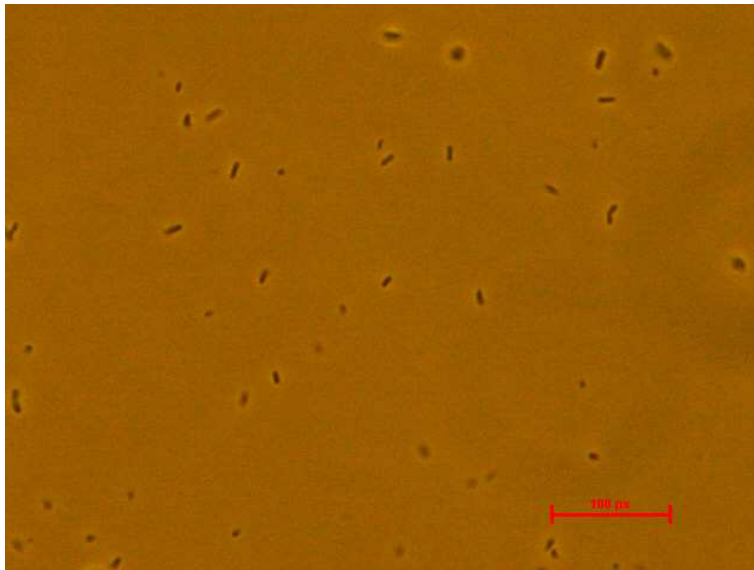


Abb. 22: Lichtmikroskopisches Bild von *Pseudomonas stutzeri* Stamm K auf 1-Hexadecanol.

Bei *Pseudomonas stutzeri* Stamm K handelt es sich um Gram-negative stäbchenförmige Bakterien, welche 1-3 µm lang sind (Abb. 22). 2-Hexadecanol kann von diesem Stamm als alleinige Kohlenstoffquelle genutzt werden, wobei Nitrat als Elektronenakzeptor dient. Des Weiteren wächst *P. stutzeri* Stamm K auch auf 1-Hexadecanol, 2-Butanol, Isoamylalkohol, Isopropanol und Hexadecanoat. Ein Wachstum auf langkettigen Alkanen und Alkenen wurde nicht nachgewiesen. Das Fettsäuremuster wies nicht die Besonderheit auf, dass es beim Wachstum auf 2-Hexadecanol, mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette, zu Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen in der Kette abgebaut wird, wie bei *D. oleovorans* (Abb. 23). Alle Eigenschaften, die im Rahmen dieser Arbeit bzw. von der DSMZ, für *P. stutzeri* Stamm K ermittelt wurden, wurden in der Tab. 5 zusammengefasst (Originaldaten der DSMZ siehe Anhang Seite 111).

Tab. 5: Eigenschaften von *Pseudomonas stutzeri* Stamm K

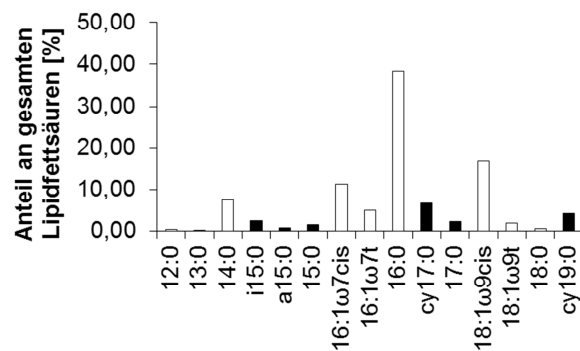
Zellform	Stäbchen
Breite µm	0,7 – 0,8
Länge µm	1,5 – 2,5
Gram-Reaktion	-
Lyse durch 3% KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Oxidase	+
Katalase	+
Hydrolyse von Gelatine	-
Hydrolyse von Esculin	-

Hydrolyse von Stärke	+
Wachstum bei 41 °C	w
Wachstum bei 42 °C	-
Wachstum auf:	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannose	-
Mannitol	-
Malat	+
Citrat	+
Caprat	+
Gluconat	-
Trehalose	-
Azelat	w
Geraniol	-
1-Hexadecanol (anaerob)	+
2-Hexadecanol (anaerob)	+
2-Butanol (anaerob)	+
Isoamylalkohol (anaerob)	+
Isopropanol (anaerob)	+
Hexadecanoat (anaerob)	+
Hexadecan (anaerob)	-
Hexadecen (anaerob)	-
Alkoholdehydrogenase	+
Urease	-
Fluoreszenz	-
Pyocyanin	-
Beweglichkeit	+

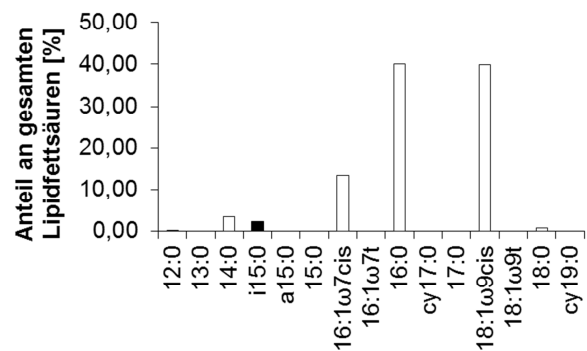
w = wahrscheinlich

Im Gegensatz zur DSMZ konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, dass *P. stutzeri* Stamm K Alkoholdehydrogenaseaktivität aufweist (siehe Tab. 7). Die Anzucht des Stammes erfolgte bei der DSMZ unter anderen, als den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen (siehe Material und Methoden 7.3), was wahrscheinlich zu einem Verlust der Enzymaktivität geführt hat.

(a) 2-Hexadecanol



(b) 1-Hexadecanol



(c) Hexadecanoat

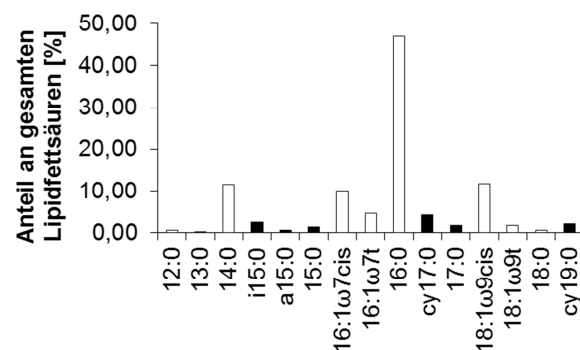


Abb. 23: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in *P. stutzeri* Stamm K auf verschiedenen Substraten. Fettsäuremuster der Zellen gewachsen auf 2-Hexadecanol (a), 1-Hexadecanol (b) und auf Hexadecanoat (c). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette. i: iso, a: anteiso, t: trans, cy: cyclisch, Me: methyliert, ω7 bzw. 9: Doppelbindung in der omega-7 bzw. 9 Position

Besonders das Wachstum von *Pseudomonas stutzeri* Stamm K auf iso-Alkoholen war für diese Arbeit von besonderem Interesse, da dieser Stamm wahrscheinlich eine spezifische Alkoholdehydrogenase besitzt, um den Alkohol abzubauen. Auch beim anaeroben Alkanmetabolismus durch *D. oleovorans* erfolgt der Abbau des iso-Alkohols vermutlich durch eine Alkoholdehydrogenase. Der Vektor mit den Genen für den Alkanhydroxylase-Komplex, der für den initialen Schritt des anaeroben Abbaus von Alkanen in *D. oleovorans* verantwortlich ist, könnte in *P. stutzeri* Stamm K transformiert werden, welcher damit in der Lage sein sollte, anaerob auf Alkanen zu wachsen. Damit würde bewiesen, dass der Alkanhydroxylase-Komplex und insbesondere die Alkanhydroxylase (EBDH-ähnliches Enzym) für den Alkan aktivierenden Schritt verantwortlich ist. Weiterhin wurde untersucht welche weiteren Enzyme an dem anaeroben Abbau des Alkohols in *P. stutzeri* Stamm K involviert sind. Ein hierzu durchgeführter Enzymtest (siehe Seite 55) zeigte, dass eine Alkoholdehydrogenase für langkettige iso-Alkohole tatsächlich nachweisbar ist. Um diese

Alkoholdehydrogenase besser charakterisieren zu können, wurde versucht diese mittels einer DEAE Sepharose FastFlow Chromatographiesäule (siehe Material und Methoden Kapitel 9.6) anzureichern. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Enzymaktivität getestet. In vier Fraktionen (Abb. 24a 1-4) konnte eine Enzymaktivität, die auf eine Alkoholdehydrogenase hinweist, detektiert werden, wobei diese allerdings sehr gering war (siehe Tab. 6). Um die Aussage des Enzymtests noch einmal zu verdeutlichen, wurde eine Aktivitätsfärbung (siehe Seite 57) mit den drei Fraktionen die die höchste Aktivität aufwiesen und dem Zellextrakt durchgeführt (siehe Abb. 24). Durch diese sensitive Methode konnte ebenfalls eine Alkoholdehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden, was die Aussage des Enzymtests bestätigte.

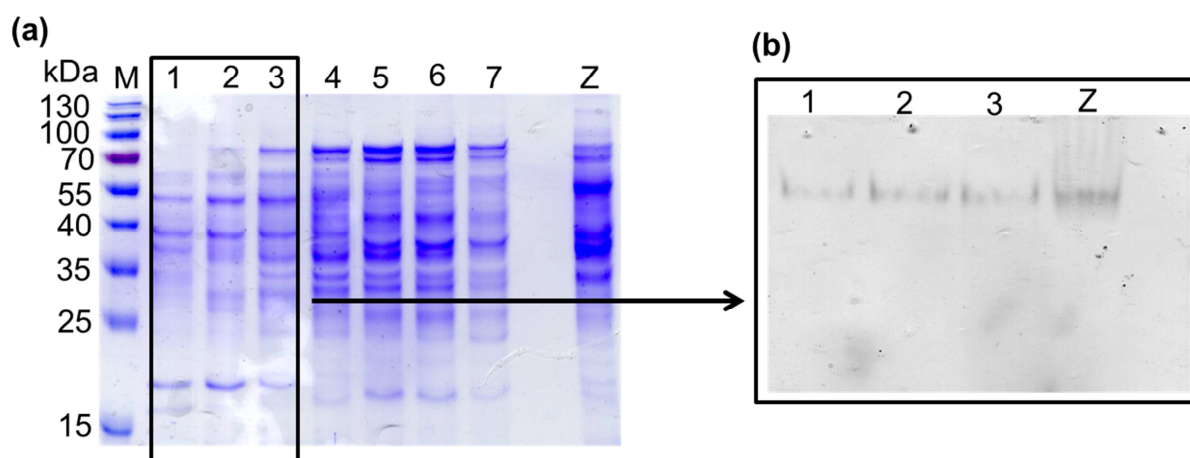


Abb. 24: SDS-PAGE und Nativ-PAGE von *P. stutzeri* Stamm K. (a) Coomassie gefärbtes 12 % SDS-Gel mit verschiedenen Fraktionen einer DEAE-Anreicherung des Zellextrakts von *P. stutzeri* Stamm K gewachsen auf 2-Hexadecanol. (b) Aktivitätsfärbung mit den ersten drei Fraktionen, die auch für die SDS-PAGE verwendet wurden und 2-Hexadecanol als Substrat. M: Proteinmarker, Z: Zellextrakt, kDa: Kilodalton

Tab. 6: Spezifische Aktivitäten der Alkoholdehydrogenase aus *P. stutzeri* Stamm K in den entsprechenden Elutionsfraktionen der Enzymanreicherung mittels Anionenaustauschersäule (DEAE); Salzkonzentration der Fraktionen 240 mM – 300 mM NaCl

Fraktion	Substrat	Spezifische Aktivität (nmol/mg/min)
1 (Abb. 24a)	2-Hexadecanol gelöst in DMSO	7,4
2 (Abb. 24a)	2-Hexadecanol gelöst in DMSO	10,2
3 (Abb. 24a)	2-Hexadecanol gelöst in DMSO	4,0
4 (Abb. 24a)	2-Hexadecanol gelöst in DMSO	1,8
1 – 4 (Abb. 24a)	DMSO (Negativkontrolle)	< 0,1

Die höchste spezifische Aktivität mit 10,2 nmol/mg/min wurde in der Fraktion zwei detektiert. Da in dem Proteinmuster dieser Fraktion keine markante Bande gegenüber dem Proteinmuster der anderen Fraktionen zu erkennen war, konnte die Größe der Alkoholdehydrogenase nicht eindeutig bestimmt werden. Eine MALDI-TOF Analyse der mittels Aktivitätsfärbung sichtbar gemachten Banden, brachte ebenfalls keine weiteren Ergebnisse, nachdem die Banden aus dem Nativgel ausgeschnitten und auf ein SDS-Gel übertragen wurden. Allerdings war die für die Analyse zur Verfügung stehende Proteinmenge auch sehr gering. Um eine größere Proteinmenge für weitere Analysen und zur Charakterisierung der Alkoholdehydrogenase zu erhalten, wurde ein 30 l Fermenter mit *P. stutzeri* Stamm K und zunächst 1-Hexadecanol, später 2-Hexadecanol als Substrat zur Induktion der entsprechenden Enzyme angesetzt. Die anaerobe Kultivierung im Fermenter verhielt sich allerdings anders als in den ansonsten verwendeten Flaschen-Kulturen, zumal eine anaerobe Zugabe von Nitrat bzw. Substrat nicht möglich war. Nach einer Inkubation von 10 Wochen wurden ca. 21 g Zellen (Nassgewicht) geerntet. Eine Reinigung über mehrere Säulen war mit dieser Ausbeute nicht möglich. Mit dem Zellextrakt (ohne Anreicherung) wurde die jeweilige Alkoholdehydrogenase-Aktivität für verschiedene Alkohole überprüft und die spezifischen Aktivitäten ermittelt (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Spezifische Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus *P. stutzeri* Stamm K mit verschiedenen Substraten.

Substrat	Spezifische Aktivität (nmol/mg/min)
Ethanol	0,5
Isoamylalkohol	< 0,1
2-Butanol	0,1
2-Propanol	1,6
2-Decanol	1,1
2-Tridecanol	1,1
2-Hexadecanol	0,9
1-Hexadecanol	< 0,1

Die spezifischen Enzymaktivitäten waren im Gegensatz zu den gemessenen Aktivitäten in der Tab. 6 geringer, da der Enzymtest mit dem Zellextrakt durchgeführt wurde. Die höchste spezifische Aktivität mit 1,6 nmol/mg/min wurde mit 2-Propanol detektiert. Die spezifische Aktivität mit langkettigen iso-Alkoholen wie 2-Decanol, 2-Tridecanol und 2-Hexadecanol war mit 0,9 – 1,1 nmol/mg/min annähernd gleich. Mit Ethanol und 2-Butanol als Substrat konnte nur eine sehr geringe spezifische Enzymaktivität mit 0,5 nmol/mg/min bzw. 0,1 nmol/mg/min detektiert werden. Eine Enzymaktivität außerhalb des Messbereiches des durchgeführten

Enzymtestes wurde mit Isoamylalkohol und 1-Hexadecanol detektiert. Wachstum auf diesen beiden Substraten war für *P. stutzeri* Stamm K jedoch möglich (siehe Tab. 5). Anscheinend ist die Alkoholdehydrogenase aus diesem Stamm für 2-iso-Alkohole relativ spezifisch, da mit dem 1-iso-Alkohol als Substrat keine messbare Aktivität detektiert werden konnte.

Um weitere Informationen über den anaeroben Abbau der iso-Alkohole durch *P. stutzeri* Stamm K zu erhalten wurde überprüft, ob an dem weiteren Abbauprozess neben der Alkoholdehydrogenase eine Biotin-haltige Carboxylase beteiligt ist, die als zusätzliches Protein induziert wird. Dabei wurde die Methode der Bindung von Biotin-Enzymen an Streptavidin beads genutzt (siehe Seite 50). Extrakte von *P. stutzeri* Stamm K-Zellen, die auf 2-Hexadecanol und Hexadecanoat angezogen wurden, wurden mit Streptavidin beads versetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur und einigen folgenden Waschrufen wurden die so gewonnenen Proben (siehe Seite 50) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Eine Bande bei ca. 66 kDa wurde in den Proben der Zellen, die auf 2-Hexadecanol und Hexadecanoat gewachsen waren, detektiert. Die Banden wurden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF analysiert. In beiden Proben wurde die Bande als Pyruvatcarboxylase identifiziert (siehe Abb. 25).

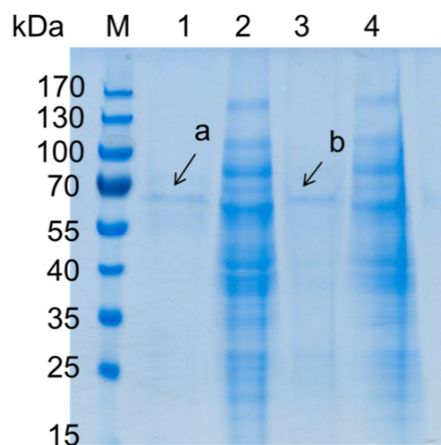


Abb. 25: An Streptavidin gebundene Proteine bzw. das gesamte Proteinmuster von *P. stutzeri* Stamm K gewachsen auf 2-Hexadecanol oder Hexadecanoat. M: Marker; 1: an Streptavidin gebundene Proteine von *P. stutzeri* Stamm K-Zellen gewachsen auf 2-Hexadecanol; 2: Proteinmuster von *P. stutzeri* Stamm K gewachsen auf 2-Hexadecanol; 3: an Streptavidin gebundene Proteine von *P. stutzeri* Stamm K-Zellen gewachsen auf Hexadecanoat; 4: Proteinmuster von *P. stutzeri* Stamm K gewachsen auf Hexadecanoat; a und b: Pyruvatcarboxylase

7. Anaerober Alkenabbau in Sulfat reduzierenden Bakterien

7.1 Klonierung von MpoX Genen in einen *broad host range* Vektor

Der zweite Aspekt, der in dieser Arbeit behandelt wurde, ist der anaerobe Abbau von Alkenen durch Sulfatreduzierer. Zu diesem Thema ist sehr wenig bekannt, aber in den meisten bekannten anaeroben Alken-Abbauern sind konservierte Gene vorhanden, die für Enzyme ähnlich zur Acetylenhydratase codieren.

Um einen Gesamtüberblick zu bekommen, welche Stämme von anaeroben Alkenabbauenden Bakterien, Gene für Enzyme enthalten, deren Produkte ähnlich zur Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus* sind, wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Dazu wurde ein multiples Sequenzalignment mit der Software Clustal Omega durchgeführt, wobei die entsprechenden Aminosäuresequenzen aus Datenbankeinträgen von NCBI (National Center for Biotechnology Information) entnommen wurden. Anhand dieses Alignments wurde der Stammbaum erstellt. Der Vergleich der Proteinsequenzen zeigt die jeweiligen Ähnlichkeiten an. In dem erstellten Stammbaum wurden die verschiedenen Proteine der Bakterienstämme zu Clustern zusammengefasst, in denen Gruppen mit hoher Sequenzidentität auf einem Sequenzast liegen (Abb. 26).

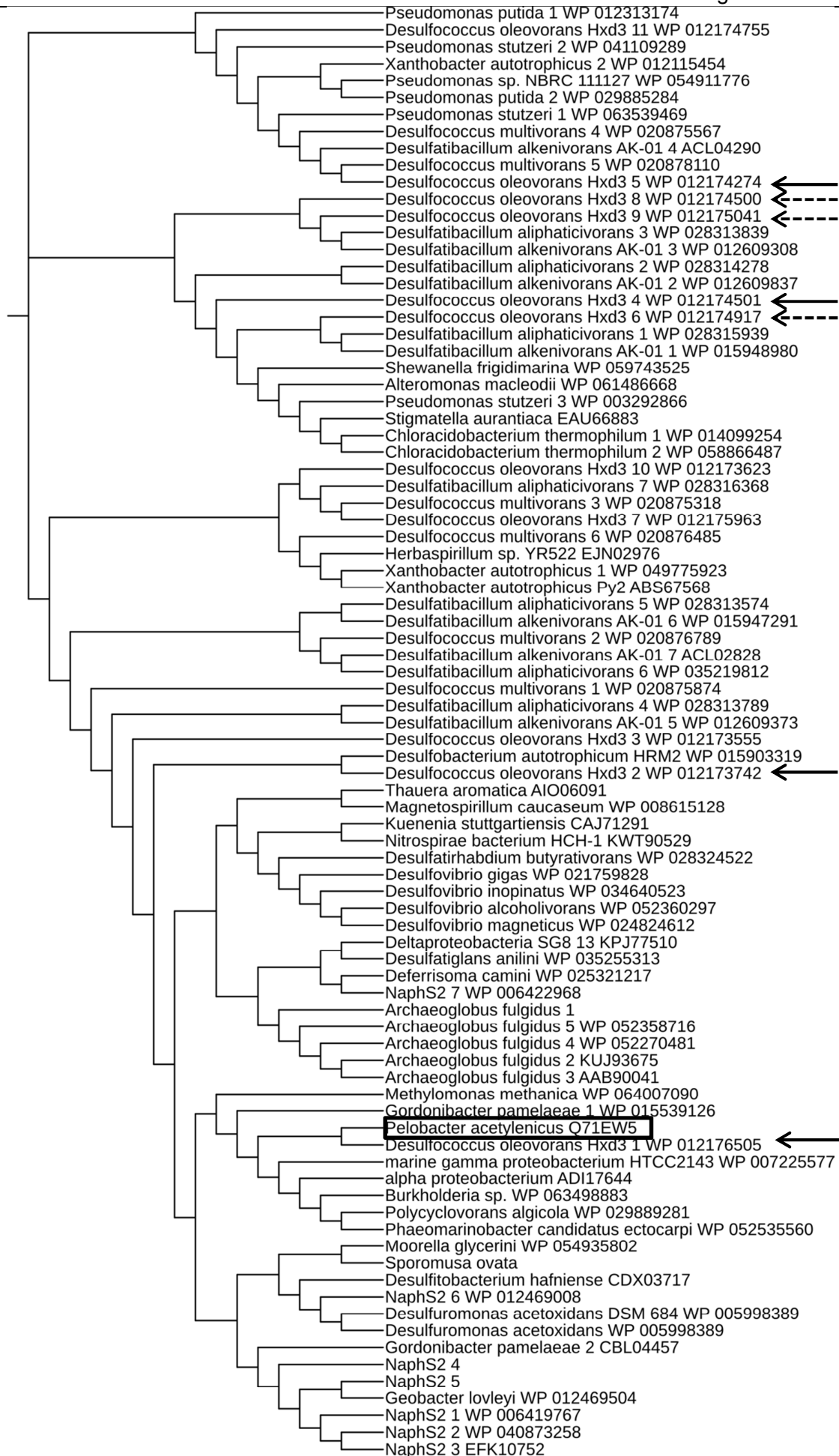


Abb. 26: Phylogenetischer Stammbaum von Acetylenhydratase-ähnlichen Enzymen aus vorwiegend anaeroben Alken abbauenden Bakterienstämmen. Die Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus* wurde durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet. Mehrere Proteine aus demselben Bakterienstamm wurden durchnummeriert. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aus *D. oleovorans* wurden mit einem Pfeil markiert. Der unterbrochene Pfeil markiert die Proteine, die für weiterführende Experimente sehr interessant wären. Die Aminosäuresequenzen wurden aus NCBI Datenbankeinträgen entnommen. Das Alignment der Sequenzen wurde mit der Software Clustal Omega (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) durchgeführt. Der Stammbaum wurde mit iTOL (itol.embl.de/) erstellt.

Anhand des Phylogenetischen Stammbaumes ist zu sehen, dass eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zwischen der Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus* und einem Protein (Protein 1) aus *D. oleovorans* Stamm Hxd3 (WP_012176505; vorhergesagte Molybdopterin-haltige Oxidoreduktase) besteht, da die beiden Sequenzäste direkt nebeneinander liegen. Das kann ebenfalls auf eine ähnliche Funktion hindeuten. Ein weiteres in dieser Arbeit verwendetes Protein aus *D. oleovorans* ist das Protein 2 (WP_012173742; vorhergesagte Molybdopterin-haltige Oxidoreduktase). Unter denen im Stammbaum betrachteten Enzymen aus *D. oleovorans* hat es die nächstgrößte Sequenzähnlichkeit zur Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus*. Dieses Protein bildet zusammen mit einem Protein aus *D. autoztophicum* einen Cluster. Die Proteine 4 und 5 aus Stamm Hxd3 wurden beispielhaft für die Enzyme aus *D. oleovorans* genommen, die eine geringere Sequenzähnlichkeit zur Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus* aufwiesen. Da die verwendeten Proteine lediglich eine ähnliche Funktion und nicht die gleiche zu der Acetylenhydratase aufweisen sollten, wurden folglich gerade Proteine mit etwas geringerer Sequenzähnlichkeit zur Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus* als mögliche Alkenhydratasen getestet. Besonders interessant bei Protein 4 aus *D. oleovorans* ist, dass es ausschließlich mit entsprechenden Proteinen anderer Alkenabbauer, also aus *Desulfatibacillum alkenivorans* Stamm AK-01 und *Desulfatibacillum aliphaticivorans*, einen Cluster bildet. Weitere Enzyme aus *D. oleovorans*, die am nächsten verwandt zu Proteinen aus anderen Alken abbauenden Bakterienstämmen (Gattung *Desulfatibacillum*) sind, sind die Proteine 6, 8 und 9. In weiterführenden Experimenten wäre es sehr interessant, auch die Gene, die für diese Enzyme codieren, in *P. stutzeri* Stamm K zu klonieren und das Wachstum auf Alkenen zu untersuchen (entsprechend Material und Methoden Kapitel 8.14).

Es wurde also die Hypothese aufgestellt, dass über dieses Acetylenhydratase-ähnliche Enzym eine Hydratisierung des Alkens an der Doppelbindung stattfindet. Das entsprechende Produkt wäre der korrespondierende n-Alkohol. Das einzige bisher bekannte Enzym, welches eine Hydratisierung an einer Mehrfachbindung katalysiert, ist die Acetylenhydratase

von *Pelobacter acetylenicus*, die die Dreifachbindung zunächst zu einem Enol hydratisiert, das dann zu Acetaldehyd tautomerisiert (Rosner and Schink, 1995; Tenbrink et al., 2011). Im Genom von *D. oleovorans* wurden vier Gene ausgewählt, deren Genprodukte Ähnlichkeit zur Acetylenhydratase aufwiesen (siehe Tab. 8). Drei der Gene für diese Proteine wurden erfolgreich in den *broad host range* Vektor pASG-wt1-MOB kloniert (siehe Abb. 27).

Tab. 8: Bezeichnungen und Accession Nummer der in dieser Arbeit verwendeten Gene die für ein Acetylenhydratase-ähnliches Enzym codieren.

Bezeichnung in der vorliegenden Arbeit	Vorhergesagtes Protein	Accession Nummer	Genbezeichnung
Mpox 1	Molybdopterin-haltige Oxidoreduktasen	WP_012176505	Dole_3092
Mpox 2	Molybdopterin-haltige Oxidoreduktasen	WP_012173742	Dole_0313
Mpox 3	Molybdopterin-haltige Oxidoreduktasen	WP_012174501	Dole_1074
Mpox 4	Formiatdehydrogenase	WP_012174274	Dole_0846

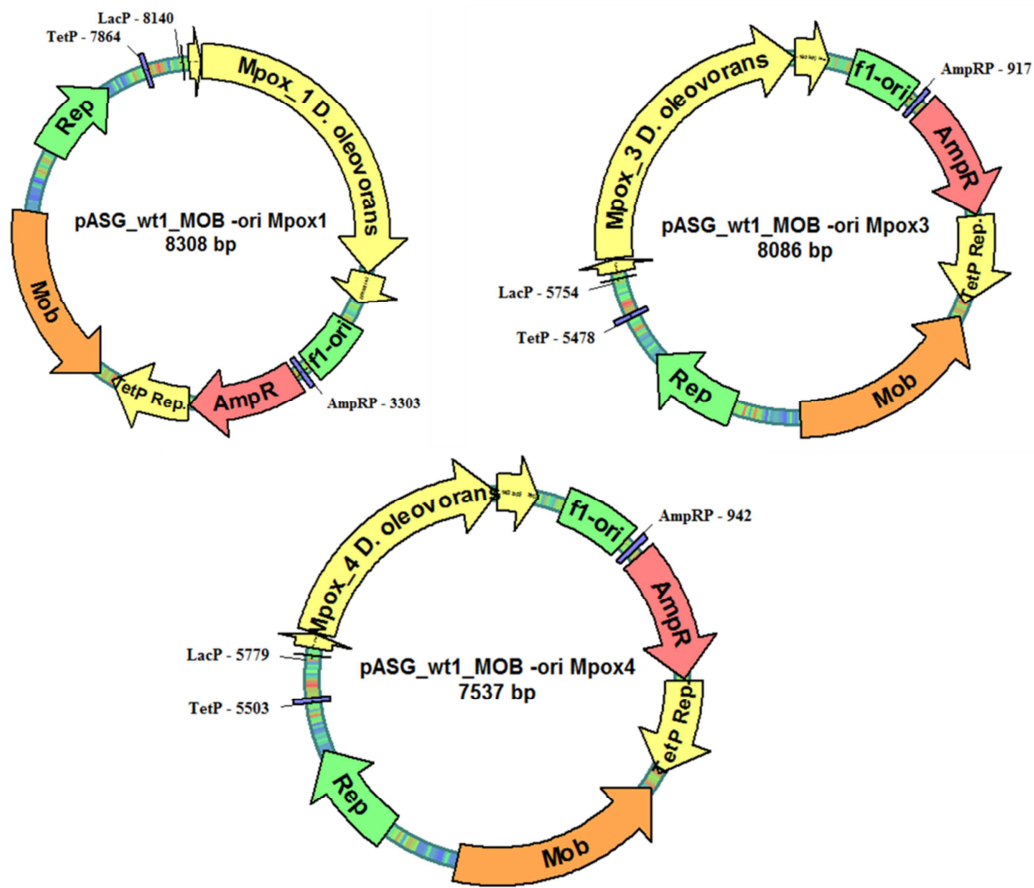


Abb. 27: Vektorkarten des Expressionsplasmids pASG-wt1-MOB mit dem jeweiligen Acetylenhydratase-ähnlichen Gen aus *D. oleovorans*, welches für eine vorhergesagte Molybdopterin-haltige Oxidoreduktase (Mpox1 und Mpox3) bzw. Formiatdehydrogenase (Mpox4) kodiert. f1-ori: Replikationsursprung des Phagen f1, AmpR: Ampicillinresistenzgen, TetP Rep.: Tetrazyklinrepressorgen, Rep: Repressorgen, TetP: Tetrazyklinpromoter, LacP: Lactosepromoter, AmpRP: Promoter des Ampizillinresistengens, MOB: Mobilisierungsgene

Die Vektoren mit den Genen für die Molybdopterin-haltige Oxidoreduktasen/ Formiatdehydrogenase aus *D. oleovorans* (Abb. 27) wurden durch Elektroporation (siehe Seite 41) in kompetente *P. stutzeri* Stamm K Zellen transformiert. Die Anzucht nach der Transformation erfolgte auf LB-Agarplatten mit Ampicillin. Nach erfolgreichem Wachstum auf den LB-Agarplatten wurden pro Vektor je fünf Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Flüssigkultur mit 100 µg/ml Ampicillin übertragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C auf dem Rotationsinkubator. 500 ml Mineralsalzmedium mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor und mit Hexadecen, 1-Hexadecanol oder Hexadecan als Substrat, wurde mit 100 µl der LB-Flüssigkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen. Als Kontrolle wurde der Wildtyp ohne Vektor verwendet. Sollte eine

der vorhergesagten Molybdopterin-haltigen Oxidoreduktasen bzw. die Formiatdehydrogenase das initiale Enzym zum Abbau von langkettigen Alkenen sein, wäre ein Wachstum auf Hexadecan als Substrat möglich. Das erste Abbauprodukt wäre 1-Hexadecanol und auf diesem kann *P. stutzeri* Stamm K wachsen. Die Beurteilung des Wachstums erfolgte sowohl optisch (siehe Tab. 9), als auch durch Messung der Konzentration des Nitrat- bzw. Nitrit-Gehaltes mit Hilfe von Nitratstäbchen.

Tab. 9: Wachstum von *P. stutzeri* Stamm K mit verschiedenen Vektoren unter anaeroben und aeroben Bedingungen, mit Hexadecen, 1-Hexadecanol oder Hexadecanoat als Substrat.

Bewertung des Wachstums nach			
	7 Tagen	15 Tagen	21 Tagen
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Stamm K anaerobe Kultivierung			
Substrat	Wildtyp ohne Plasmid		
Hexadecen	-	-	-
1-Hexadecanol	+	++	++
Hexadecanoat	+	++	++
	mit pASG-wt1-MOB_Mpox1		
Hexadecen	-	-	-
1-Hexadecanol	+	+	+ (+)
Hexadecanoat	++	++	++
	mit pASG-wt1-MOB_Mpox3		
Hexadecen	-	-	-
1-Hexadecanol	++	++	++
Hexadecanoat	++	++	++
	mit pASG-wt1-MOB_Mpox4		
Hexadecen	-	-	-
1-Hexadecanol	+	++	++
Hexadecanoat	++	++	++
<i>Pseudomonas stutzeri</i> Stamm K aerobe Kultivierung			
	Wildtyp ohne Plasmid		
Hexadecen	-	-	-
1-Hexadecanol	+	+	+
Hexadecanoat	++	++	++
	mit pASG-wt1-MOB_Mpox1		
Hexadecen	-	+	+
1-Hexadecanol	-	(+)	+
Hexadecanoat	++	++	++
	mit pASG-wt1-MOB_Mpox3		
Hexadecen	-	-	-
1-Hexadecanol	-	-	+
Hexadecanoat	++	++	++
	mit pASG-wt1-MOB_Mpox4		
Hexadecen	-	-	(+)
1-Hexadecanol	-	-	+
Hexadecanoat	++	++	++

- kein Wachstum; + Wachstum; ++ gutes Wachstum

Alle anaeroben Kulturen wuchsen auf 1-Hexadecanol und Hexadecanoat. Ein Wachstum auf Hexadecen wurde nicht detektiert. Bei den aeroben Kulturen wurde ebenfalls Wachstum auf 1-Hexadecanol und Hexadecanoat nachgewiesen. Das Wachstum auf 1-Hexadecanol war geringer als das in den anaeroben Kulturen und teilweise erst nach drei Wochen erkennbar. Nach zwei Wochen aerober Inkubation wurde Wachstum auf Hexadecen mit dem Vektor pASG-wt1-MOB_Mpox1 nachgewiesen, nach drei Wochen auch in der Kultur mit *P. stutzeri* Stamm K mit dem Plasmid pASG-wt1-MOB_Mpox4 (geringeres Wachstum als mit pASG-wt1-MOB_Mpox1). Es ist sehr interessant, dass Wachstum bei *P. stutzeri* Stamm K mit den Vektoren pASG-wt1-MOB_Mpox1 bzw. pASG-wt1-MOB_Mpox4, wenn auch unter aeroben Bedingungen, vorhanden war. Das könnte darauf hindeuten, dass eventuell die entsprechenden Gene die für eine vorhergesagte Molybdopterin-haltige Oxidoreduktase bzw. Formiatdehydrogenase codieren, tatsächlich im Alkenmetabolismus eine Rolle spielen könnten.

7.2 Wachstum von *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* ohne Wolfram

Es wird vermutet, dass der anaerobe Abbau von Alkenen durch eine Hydratationsreaktion als initialen Schritt erfolgt (siehe Einleitung Kapitel 4 Seite 19). Das einzige bekannte Enzym, das Wasser an eine Mehrfachbindung addiert, ist die Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus*. Da es sich bei diesem Protein um ein Wolfram-Enzym handelt, welches bei Abwesenheit von Wolfram nur eine eingeschränkte Aktivität aufweist (Rosner and Schink, 1995), sollte überprüft werden, ob die Verfügbarkeit von Wolfram bei *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* sich auf das Wachstum auswirkt. Eine fehlende Wolfram-Versorgung sollte dabei zu einem langsameren Wachstum führen.

Deshalb wurden Kulturen von *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* angesetzt, die möglichst kein Wolfram im Medium enthalten. Zum Ansetzen dieses Mediums wurde besonders reines Wasser aus einer Millipore Wasseraufbereitungsanlage genutzt. Dabei handelt es sich um Reinstwasser, welches zu einem hohen Grad deionisiert wurde und somit möglichst wenig Ionen bzw. Verunreinigungen wie Wolfram enthält. Die Selenit/Wolframat Lösung (siehe Seite 34) wurde ohne Wolframat hergestellt. Als Substrat wurde Hexadecen genutzt, um auf diesem Weg herauszufinden, ob das Enzym für den anaeroben Alkenabbau ein Wolfram-Enzym ist wie die Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus*. Das Wachstum wurde mittels Sulfidbestimmung (siehe Seite 58) detektiert. Es war allerdings kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen und der Kultivierung mit oder ohne Wolfram erkennbar. Auch nach dreimaligem Überimpfen, wo davon ausgegangen werden konnte, dass kein übertragenes Wolfram aus der Ausgangskultur mehr vorhanden war, war in allen Kulturen ein sehr ähnliches gutes Wachstum zu detektieren.

Diskussion

1. Anaerober Alkanabbau durch *D. oleovorans*

Für den Alkan-abbauenden sulfatreduzierenden Bakterienstamm *D. oleovorans* Hdx3 wurde bereits früher beschrieben, dass er neben Alkanen und Alkenen auch auf langkettigen iso-Alkoholen wächst (Aeckersberg et al., 1991; Aeckersberg et al., 1998). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuche bestätigen diese Beobachtung. Bislang wurde allerdings nicht untersucht, ob diese langkettigen iso-Alkohole möglicherweise Intermediate des anaeroben Abbaus von Alkanen sind. Unsere Daten zu den Fettsäuremustern von *D. oleovorans* auf Hexadecan und 2-Hexadecanol im Rahmen dieser Arbeit weisen nun darauf hin, dass der Alkohol ein Abbauprodukt des Alkans sein könnte. In beiden Fettsäuremustern dominierten ungeradkettige Fettsäuren, ganz im Gegenteil zu den Fettsäuremustern des Stammes bei Wachstum auf Hexadecen oder Hexadecanoat, bei denen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen dominierten (siehe Abb. 8). Die Wachstumsexperimente mit gemischten Substraten, die geradkettige bzw. ungeradkettige Fettsäuren ergeben (siehe Abb. 11, Abb. 12) zeigten eindeutig, dass der Stoffwechsel der iso-Alkohole gegenüber dem der Alkane stark bevorzugt wird. Erst ab einer Verdünnung von 1:100 (iso-Alkohol 10 μM : Alkan 1 mM) wurde das Hexadecan vermehrt angegriffen und in Fettsäuren eingebaut. Bei einem Experiment mit gemischtem Heptadecan und 2-Hexadecanol verhielt es sich ähnlich: hier wurden erst ab einer Verdünnung von ca. 1:1000 (iso-Alkohol 1 μM : Alkan 1 mM) mehr geradkettige als ungeradkettige Fettsäuren detektiert, was für einen leicht erhöhten Abbau des Heptadecans sprach (siehe Abb. 11). Dass die iso-Alkohole gegenüber den Alkanen bevorzugt werden, ist plausibel, da beim Abbau dieser Intermediate der aktivierende, vermutlich Energie verbrauchende Schritt (s.u.) nicht mehr notwendig ist. Auch konnte die Aussage von Aeckersberg (1998) bestätigt werden, dass Alkene nicht über eine Desaturierung aus dem anaeroben Alkanabbau entstehen, da die Fettsäuremuster diesen Schluss widerlegen. Bei den Wachstumsversuchen mit Alkanen und Alkenen in einer Kultur, wurde deutlich, dass *D. oleovorans* Alkene gegenüber den Alkanen eindeutig bevorzugte. Erst bei einer Verdünnung von 1:500 (Alken 2 μM : Alkan 1 mM) wurden etwas mehr ungeradkettige Fettsäuren detektiert, was auf einen Alkanabbau hindeutete (siehe Abb. 10). Dieses Experiment verdeutlicht auch noch einmal, dass Alkane und Alkene auf unterschiedlichen Wegen abgebaut werden müssen. Man kann auch vermuten, dass der anaerobe Abbau von Alkenen durch *D. oleovorans* mit deutlich weniger Aktivierungsenergie abläuft als der initiale Schritt des Alkanabbaus, da Alkene in den Experimenten als Substrat deutlich bevorzugt wurden. Schließlich wurde das 2-Hexadecanol auch mittels GC/MS in kleineren Mengen als Intermediat, in einer auf Hexadecan wachsenden Kultur von *D.*

oleovorans, nachgewiesen. Dazu wurde die Kultur mit n-Hexan extrahiert (siehe Seite 59) und der Extrakt mit Hilfe der GC/MS analysiert. Die Konzentration des iso-Alkohols war ca. 170-mal geringer (ca. 5,9 μM) als die des eingesetzten Substrats (1 mM), was die Detektion sehr schwierig machte. In auf Hexadecen wachsenden Zellen konnte dagegen kein 2-Hexadecanol nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund dieser Daten ein neuer anaerober Alkan-Abbauweg für das Sulfat reduzierende Bakterium *Desulfococcus oleovorans* Stamm Hxd3 postuliert (Abb. 28).

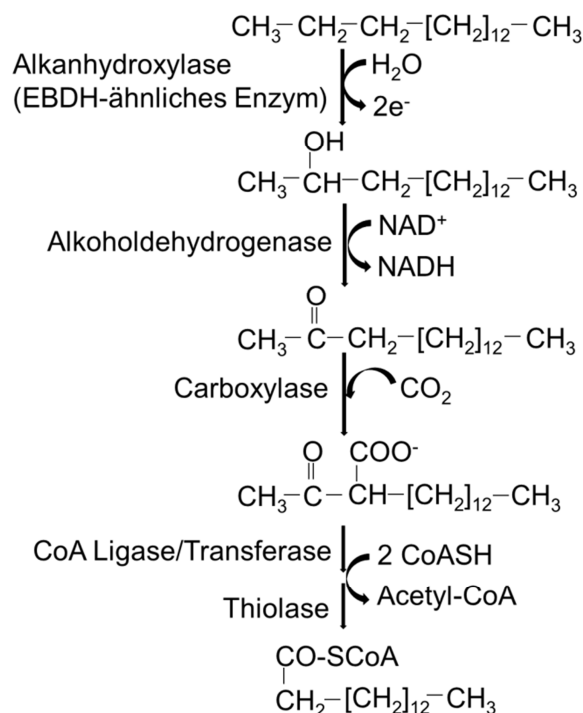


Abb. 28: Postulierter Abbauweg von *D. oleovorans* Stamm Hxd3 bei anaerobem Wachstum auf Hexadecan.

Der initiale Schritt des anaeroben Abbaus von Alkanen ist demnach eine Hydroxylierung am C₂, wobei der resultierende iso-Alkohol entsteht. Als Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, wird eine Sauerstoff-unabhängige Alkanhydroxylase vorgeschlagen, die im Genom von *D. oleovorans* kodiert ist. Sie ist der Ethylbenzoldehydrogenase, welche die initiale Hydroxylierung des Ethylbenzols katalysiert, sehr ähnlich. Die Untereinheiten der postulierten Alkanhydroxylase sind allerdings in einem größeren Gencluster kodiert, der möglicherweise weitere Gene für einen direkt assoziierten Membrankomplex beisteuert, der für die Hydroxylierung der Alkane vermutlich zusätzlich gebraucht wird (siehe Abb. 29). Der postulierte neue Alkan-Abbauweg wird danach durch eine Alkoholdehydrogenase weitergeführt, die die langkettigen iso-Alkohole zu den Ketonen oxidiert. Diese können dann am C₃-Atom carboxyliert werden, was zur Entstehung einer verzweigten 2-Acetyl-Fettsäure

führt. Diese wird dann zum CoA-Thioester aktiviert und thiolytisch zu Acetyl-CoA und einer aktivierten unverzweigten CoA-Fettsäure gespalten, welche weiter durch β -Oxidation abgebaut werden kann.

Hydroxylierungsreaktionen als initialer Schritt des anaeroben Abbaus von Aromaten oder Kohlenwasserstoffen kommen häufiger vor. Der aktivierende Schritt des anaeroben Abbaus von *p*-Cresol durch das obligat anaerob wachsende Bakterium *Geobacter metallireducens* bzw. durch *Achromobacter* sp. ist eine Hydroxylierung der Methylgruppe (Hopper et al., 1991; Peters et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte nur 2-Hexadecanol als Metabolit des anaeroben Alkanabbaus nachgewiesen werden. Die Nachweise für die anderen Intermediate des postulierten Abbauweges müssen noch erbracht werden.

2. Anaerober Abbau von Alkanen durch *D. alkenivorans* im Vergleich zu *D. oleovorans*

Als induziertes Enzym in *D. alkenivorans* auf Hexadecan wurde in dieser Arbeit nur die Alkylsuccinatsynthase I (AssA1) identifiziert, welche die Fumarat-Addition als initialen Schritt des anaeroben Alkanabbaus in diesem Stamm katalysiert (Callaghan et al., 2008). Weitere induzierte Enzyme des Alkan- oder Alkenabbaus wurden nicht detektiert. Die Fettsäuremuster, die auch von *D. alkenivorans* analysiert wurden, zeigten Unterschiede in der Bevorzugung von Substraten im Gegensatz zu *D. oleovorans*. So wurde zwar zwischen Alkanen und Alkenen differenziert, aber nicht im gleichen Ausmaß wie bei *D. oleovorans*. In einem Mischverhältnis von Alken zu Alkan von 1:2 wurde von *D. alkenivorans* das Hexadecen leicht bevorzugt, wie man am Fettsäuremuster erkennen kann (siehe Abb. 13). In der Abb. 9 ist zu sehen, dass beim Abbau von Hexadecan größtenteils geradkettige Fettsäuren entstanden, nur ein geringer Anteil von ungefähr 5 % an den gesamten Lipidfettsäuren waren ungeradkettig. So sollte auch zu erwarten sein, dass bei einem Wachstum von *D. alkenivorans* auf einem ungeraden Alkan fast ausschließlich ungeradkettige Fettsäuren entstehen. Das war bei der Fettsäureanalyse mit Heptadecan als Substrat nicht der Fall, was allerdings daran liegen könnte, dass die Zellen, die zum Animpfen verwendet wurden, zuvor auf Hexadecan gewachsen waren. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen noch nicht vollständig an das neue Substrat adaptiert waren und auch beim Überimpfen ein geringer Anteil von Hexadecan mit in die neue Kultur übertragen wurde, was dann als Substrat verwendet werden konnte. Das wäre eine Erklärung, warum in der Analyse der Fettsäuren auf Heptadecan noch relativ viele Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen vorlagen. Beim Abbau des geradkettigen Alkens entstanden fast ausschließlich Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in

der Kohlenstoffkette, nur ca. 1 % der gesamten Lipidfettsäuren waren ungeradkettig. In den weiteren Verdünnungsstufen von 1:100 bis 1:2000 wurde vorrangig das Heptadecan abgebaut, da es in einer wesentlich höheren Konzentration als das Alkan vorlag. Es wird klar, dass der aktivierende Schritt des anaeroben Abbaus von Alkanen in *D. alkenivorans* Stamm AK-01 nicht derselbe wie in *D. oleovorans* sein kann. Der initiale Schritt in diesem Bakterium erfolgt durch die Addition von Fumarat an das Alkan (Callaghan et al., 2006). Es wird wiederum eindeutig ersichtlich, dass *D. oleovorans* Alkane auf einem anderen Weg als *D. alkenivorans* abbauen muss und dass dieser Schritt wahrscheinlich ebenfalls mit einem hohen Energieaufwand verbunden ist, da das Alken streng bevorzugt wurde.

Im Fettsäuremuster von Zellen von *D. alkenivorans* Stamm AK-1, die auf geradkettigen Alkanen (z.B. Hexadecan) oder ungeradkettigen iso-Alkoholen (z.B. 2-Tridecanol) gewachsen waren, war auffallend, dass der Abbau beider Substrate zu Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen führte. Somit wurden in den Kulturen mit gemischten Substraten ebenfalls zum größten Teil Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen detektiert. Damit unterscheidet Stamm AK-01 sich in seinem Isoalkohol-Abbauweg deutlich von *D. oleovorans*. Wahrscheinlich wurden die Fettsäuren, die durch den Abbau der Isoalkohole entstanden sind, vollständig durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA Einheiten abgebaut. Für die Fettsäurebiosynthese wurden dann neue Fettsäuren synthetisiert, sodass die vorwiegend geradkettigen Lipidfettsäuren entstanden, die bei der Analyse detektiert wurden (siehe Abb. 14). Anhand der Abb. 14 wird ersichtlich, dass die Fettsäuren nicht direkt aus dem ungeradkettigen Tridecanol gebildet worden sein konnten, da wie gesagt überwiegend Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Kohlenstoffkette bei der Analyse vorlagen. Bei *D. oleovorans* hingegen wurden die Fettsäuren der Lipide wahrscheinlich direkt aus Abbau-Intermediaten des iso-Alkohols gebildet.

3. Alkanhydroxylase und Alkanhydroxylase-Komplex

Das induzierte Enzym in Zellen von *D. oleovorans*, die auf Hexadecan gewachsen waren, hat eine hohe Ähnlichkeit zur EBDH. Wie bereits erwähnt, ist die Ethylbenzoldehydrogenase ein lösliches periplasmatisches Molybdänenzym, welches den initialen Schritt des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol in dem denitrifizierenden Bakterium *A. aromaticum* katalysiert (Fuchs et al., 2011; Johnson et al., 2001; Kloer et al., 2006; Kniemeyer and Heider, 2001). Das EBDH-ähnliche Enzym aus *D. oleovorans*, welches als Alkanhydroxylase in dieser Arbeit postuliert wird, ist zu 40 % identisch und weist eine Ähnlichkeit der Aminosäuren auf alle drei Untereinheiten des aktiven Proteins bezogen von 57 % auf. Die konservierten Merkmale wie der Twin-Arginin Typ des Signalpeptids in der α -Untereinheit und auch die

konservierten Aminosäuren, die an der Bindung des *bis*-Molybdopteringuanidinnukleotid Cofaktors, sowie der Fe-S-Zentren und des Häm *b* Cofaktors beteiligt sind (Kloer et al., 2006), legen nahe, dass die Alkanhydroxylase ähnliche biophysikalische Eigenschaften wie die EBDH haben muss. Gene für dieses Enzym wurden bisher einzig im Genom von *D. oleovorans* gefunden und bisher noch in keinem anderen Organismus, der Alkane anaerob abbauen kann. Bei den meisten anderen Enzymen, die mittels MALDI-TOF analysiert wurden, handelte es sich um Proteine der β -Oxidation (Tab. 4).

Die Gene, die für die Alkanhydroxylase (α -, β -, und γ -Untereinheit) kodieren, liegen mit weiteren Genen auf einem apparenten Operon. Die Abstände zwischen den einzelnen Genen sind nur sehr gering und liegen meistens unter 50 bp, höchstens aber bei 137 bp. Die zusätzlichen Gene kodieren für Proteine, die auf die Ausbildung eines Cytochrom *bc*₁-ähnlichen Komplexes hindeuten, ähnlich zu anderen Elektrontransport-Komplexen von Sulfat reduzierenden Bakterien, die bereits beschrieben wurden (Pereira et al., 2011; Pereira et al., 1999a). Für das gesamte Operon wird in dieser Arbeit postuliert, dass es für einen Alkanhydroxylase-Komplex kodiert, der in der Abb. 29b dargestellt ist. Es wurde schon früher gezeigt, dass ein Membran-gebundener *bc*-Komplex (ähnlich zum *bc*₁ Komplex/Komplex III der Atmungskette) des thermohalophilen Bakteriums *Rhodothermus marinus* eine wichtige Rolle im Elektronentransport einnimmt (Pereira et al., 1999b). Auch der in dieser Arbeit postulierte Komplex ist möglicherweise am Elektronentransport in *D. oleovorans* beteiligt. So wird möglicherweise der endergone Transfer von Elektronen aus der Hydroxylierung der Alkane (E° von ungefähr 0 V) von einem vermuteten mittleren Potential des Häm *b* durch einen Strom von Protonen über die Membran gekoppelt (siehe Abb. 29).

Genauer gesagt, werden die Elektronen, die bei der Hydroxylierungsreaktion von Hexadecan zu 2-Hexadecanol entstehen, wahrscheinlich von den Alkanhydroxylase Komponenten (AhyABC, Abb. 29b) des Komplexes, welche sich auf der Seite des Periplasmas befinden, auf die an die Membran gebundenen Untereinheiten (AhyE-J, Abb. 29b) übertragen. Die Elektronen werden zunächst auf ein Octahäm Cytochrom *c* (AhyJ, Abb. 29b) übertragen, gefolgt von einem Rieske-Typ Protein (AhyF, Abb. 29b) und der Cytochrom *bc*₁-ähnlichen Untereinheit (AhcH, Abb. 29b), um schließlich Menachinon zu Menachinol zu reduzieren. Da die meisten Untereinheiten des Alkanhydroxylase-Komplexes stark hydrophob sind, erklärt sich möglicherweise, warum sie nicht wie die löslichen Untereinheiten der Alkanhydroxylase mittels SDS-PAGE Analyse als Alkan-induzierte Proteine nachgewiesen wurden. Für den reversen Elektronentransfer des aktivierenden Schritts des Alkanabbaus in *D. oleovorans* muss Energie investiert werden. Das würde eventuell auch die Tatsache erklären, warum dieser Stamm nur Alkane mit einer Kettenlänge mit mehr als zehn Kohlenstoffatomen abbauen kann (Aeckersberg et al., 1991). Es müssen genug Acetyl-CoA Einheiten zur

Verfügung stehen, so dass für den Energie verbrauchenden initialen Schritt ein energetischer Ausgleich geschaffen werden kann.

Cytochrom *bc₁* Komplexe sind membrangebundene Proteinkomplexe, die Elektronen von einem Chinon mit niedrigen Redoxpotential auf ein Cytochrom *c* mit höherem Redoxpotential übertragen (Hunte et al., 2003; Trumpower, 1990). Sie kommen sowohl bei Gram-negativen, als auch bei Gram-positiven Bakterien vor, unabhängig davon ob die Bakterien aerob oder anaerob wachsen. Archaea besitzen diese Komplexe in der Regel nicht. *bc₁*-Komplexe bestehen immer aus einem Rieske-Typ Eisen-Schwefel Protein mit 2Fe-2S Cluster, Cytochrom *b* und Cytochrom *c* (Trumpower, 1990). Aerobe Gram-negative Bakterien in denen Cytochrom *bc₁* Komplexe identifiziert wurden sind unter anderem *Rhodobacter spaeroides* (Ljungdahl et al., 1987; Yu et al., 1984), *Rhodobacter capsulatus* (Ljungdahl et al., 1987), *Pseudomonas stutzeri* (Kucera et al., 1988) und *Paracoccus denitrificans* (Yang and Trumpower, 1986). Der thermophile *Bacillus* Stamm PS3 ist das erste Gram-positive Bakterium in dem ein *bc₁*-Komplex identifiziert wurde (Kutoh and Sone, 1988). Das fakultativ anaerobe Bakterium *A. aromaticum* Stamm EbN1, welches anaerob mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor wachsen kann, besitzt ebenfalls Gene, die für einen *bc₁* Komplex kodieren (Rabus et al., 2005). Ein Multihäm-*bc*-Komplex wurde aus *Rhodothermus marinus* isoliert (Pereira et al., 1999a; Pereira et al., 1999b). Auch bei dem in dieser Arbeit postulierten Komplex hat das Cytochrom *c* wahrscheinlich acht Hämgruppen, was einem Multihäm entspricht. Cytochrome vom *c*-Typ mit mehreren Hämen kommen insbesondere bei anaeroben Bakterien vor. In dem Schwefel reduzierenden *Desulfuromonas acetoxidans* wurden zwei Multihäm-Cytochrome mit sechs bzw. acht Hämen identifiziert (Pereira et al., 1997). Ebenso wurde in dem Sulfat und Nitrat reduzierenden Bakterium *Desulfovibrio desulfuricans* Stamm ATCC 27774 ein Cytochrom *c* mit neun Hämen isoliert, wobei acht der neun Häme als zwei Tetrahäm-Cluster angeordnet sind, die sich am Ende des Moleküls befinden. Das neunte Häm liegt dazwischen (Matias et al., 1999a; Matias et al., 1999b). In *Desulfovibrio vulgaris* wurde ein Cytochrom *c* mit 16 Hämgruppen detektiert (Higuchi et al., 1987). Es gibt noch viele weitere Multihäm-Cytochrome in anaerob wachsenden Sulfat, Schwefel oder Nitrat reduzierenden Bakterien, wobei die meisten Multihäm-Cytochrome für den Elektronentransport zuständig sind, manche aber auch enzymatische Funktionen besitzen (Pereira et al., 1997). Bei dem Octahäm-Cytochrom *c* im Alkanhydroxylase-Komplex (siehe Abb. 29) wird vermutet, dass es zum Elektronentransport dient, aber ebenfalls auch Elektronen aus der Alkan-Hydroxylierung zwischenspeichern kann.

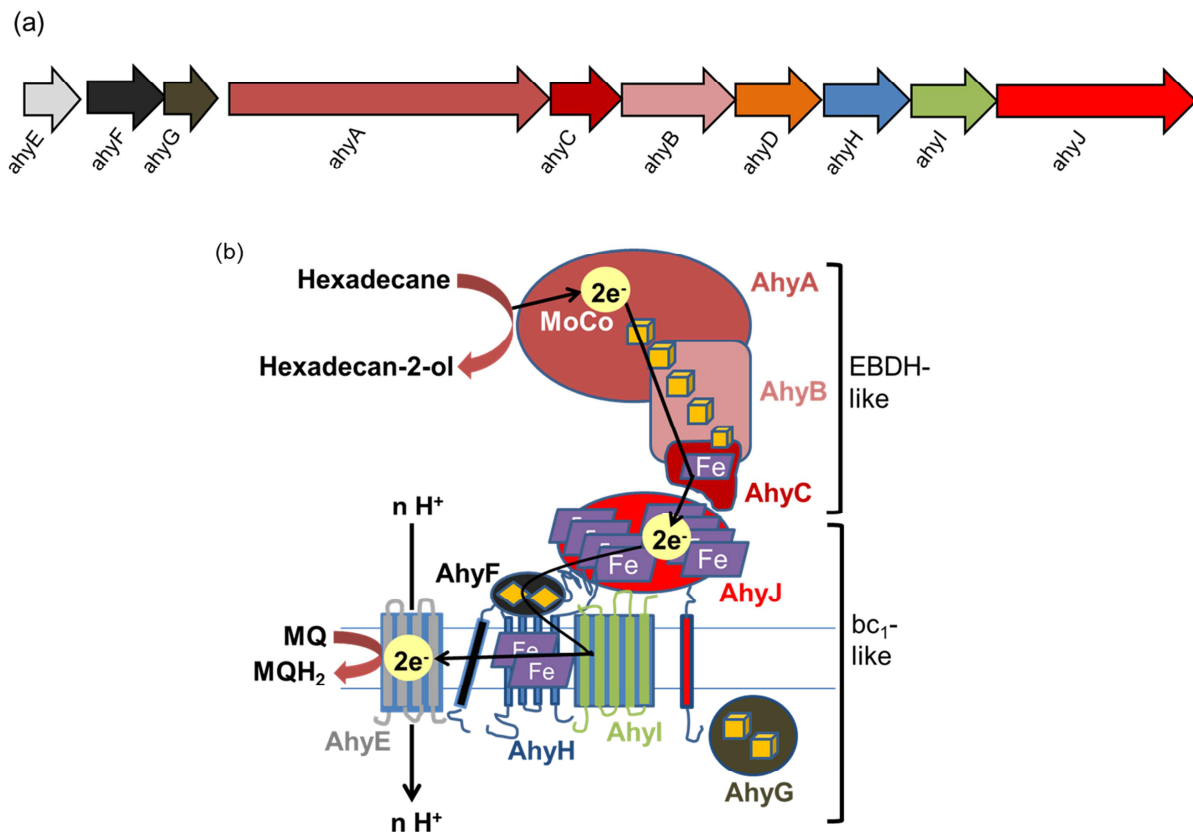


Abb. 29: Postulierter Alkanhydroxylase-Komplex in *D. oleovorans*. (a) Schematische Darstellung der Genorganisation des vermuteten Operons, welcher für den postulierten Alkanhydroxylase-Komplex kodiert (Accession Nummern der Genprodukte WP_012173620 bis WP_012173629). *ahyABC*: Alkanhydroxylase Untereinheit A-C, *ahyD*: ist am Einbau des Molybdän Cofaktors beteiligt, *ahyE*: hypothetisches Protein, *ahyF*: Rieske-Typ Protein, *ahyG*: Ferredoxin-Typ Protein, *ahyH*: Cytochrom bc_1 Untereinheit, *ahyI*: hypothetisches Protein, *ahyJ*: Octahäm Cytochrom c ; (b) Model des postulierten Alkanhydroxylase-Komplex und dessen Funktion. AhyABC sind die drei Untereinheiten der EBDH-ähnlichen Alkanhydroxylase. AhyE-J sind die Untereinheiten eines Cytochrom bc_1 -ähnlichen Membrankomplex, welcher in den reversen Elektronentransfer auf Menachinon involviert sein könnte. MoCo: Molybdän Cofaktor, Würfel 4Fe-4S Cluster (groß) bzw. 3Fe-3S Cluster (klein), Raute: 2Fe-2S Cluster, Raute mit Fe: Häm

4. Alternative iso-Alkoholdehydrogenase

Da der Nachweis einer iso-Alkoholdehydrogenase in dem Zellextrakt von *D. oleovorans* Stamm Hxd3 auf Hexadecan nicht möglich war, wurde nach Alternativen gesucht, um ein solches Enzym für den anaeroben Abbau von langkettigen Alkanen nachweisen zu können. Ebenfalls wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, das 2-Hexadecanol als Intermediat des anaeroben Abbaus von Alkanen in *D. oleovorans* nachzuweisen. Dazu wurden aus der

Umwelt an Stellen, die augenscheinlich mit Öl verschmutzt waren Proben entnommen. Aus diesen Proben wurden anschließend einige Bakterienstämme angereichert. Schließlich wurde ein Bakterienstamm der Gattung *Pseudomonas* in Reinkultur isoliert, der u.a. 2-Hexadecanol unter anaeroben Bedingungen abbaut und von der DSMZ als *Pseudomonas stutzeri* identifiziert wurde (Eigenschaften siehe Tab. 5; Daten DSMZ Seite 111-113). In dieser Arbeit wird er als *Pseudomonas stutzeri* Stamm K bezeichnet. Zellen dieses Stammes, die auf 2-Hexadecanol angezogen wurden, wurden lysiert und auf Alkoholdehydrogenaseaktivität untersucht. Die Extrakte zeigten tatsächlich Enzymaktivität. Mittels einer Reinigung durch eine Anionenaustauschersäule mit DEAE-Sepharose wurde das Enzym angereichert (siehe Material und Methoden Kapitel 9.6) und auf die Umsetzung verschiedener Alkohole als Substraten getestet. Die detektierte Alkoholdehydrogenase konnte verschiedene Alkohole abbauen wie z. B. langkettige iso-Alkohole, Isopropanol und Isoamylalkohol (siehe Tab. 7). Durch Anzucht des Stammes *Pseudomonas stutzeri* Stamm K (siehe Material und Methoden Kapitel 7.5) sollte so viel Zellmasse gewonnen werden, dass mit der Alkoholdehydrogenase weitere Reinigungsschritte durchgeführt werden können, um diese in einen möglichst reinen Zustand zu erhalten. Die gereinigte Alkoholdehydrogenase soll in einem gekoppelten Test mit Hexadecan gewachsenen *D. oleovorans* Zellen bzw. Zellextrakt eingesetzt werden. Bei vorhandenen 2-Hexadecanol, was durch die vorangegangene Hydroxylierung von Hexadecan durch die vermutete Alkanhydroxylase entstanden ist, könnte der Nachweis der Aktivität der iso-Alkoholdehydrogenase erbracht werden. Da die Ausbeute aus dem Fermenter mit 21 g relativ gering war und die Zellen auch für andere Tests benötigt wurden, konnte der gekoppelte Enzymtest in der vorliegenden Arbeit nicht realisiert werden.

P. stutzeri Stamm K wurde auch als geeigneter Klonierungswirt, bei der Transformation der Acetylenhydratase-ähnlichen Enzyme aus *D. oleovorans* eingesetzt. Die Eigenschaft des Stammes, langkettige iso-Alkohole abzubauen war dabei essentiell.

5. Anaerober Alkenabbau durch Sulfatreduzierer

Der anaerobe Alkenabbau durch Sulfat reduzierende Mikroorganismen wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht, da über den Abbau von Alkenen bisher nur sehr wenig bekannt ist und Sulfatreduzierer eine Gruppe von Bakterien sind, die Alkene anaerob abbauen können. In der SDS-PAGE Analyse von *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* wurde kein signifikanter Hinweis auf induzierte Enzyme mit Hexadecen als Substrat gefunden (siehe Abb. 6 und Abb. 7). Die Fettsäureanalyse zeigte, dass beim Abbau von Hexadecen in beiden Stämmen hauptsächlich Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Kette entstanden (siehe Abb. 8 und Abb. 9). Für *D. oleovorans* bedeutet das, dass Alkane und Alkene nicht

über den gleichen Stoffwechselweg abgebaut wurden. In *D. alkenivorans* wurden bisher keine Hinweise darauf gefunden, dass auch Alkene über eine Fumarat-Addition aktiviert werden. Wahrscheinlich bauen beide Sulfatreduzierer langkettige Alkene durch denselben Mechanismus ab. Die Theorie der Hydratisierung als initialen Schritt des anaeroben Alkenabbaus (Schink, 1985) wurde in der vorliegenden Arbeit herangezogen, um einen möglichen anaeroben Abbauweg von Alkenen durch Sulfat reduzierende Bakterien zu postulieren (siehe Abb. 30).

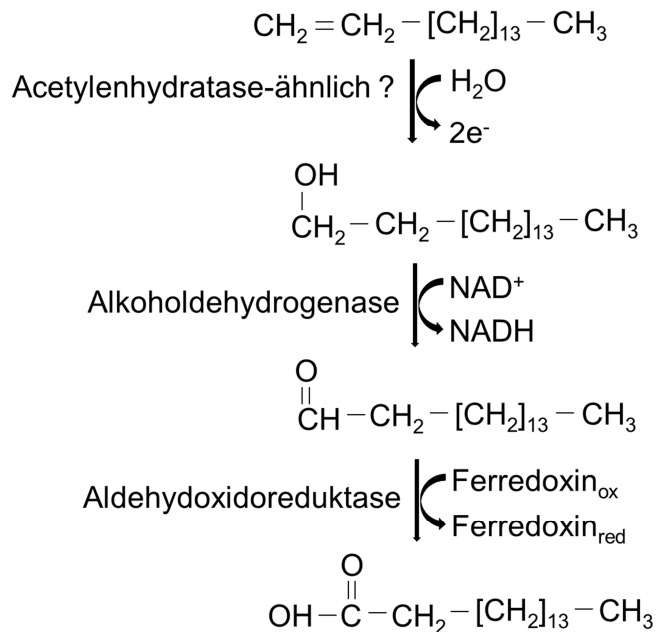


Abb. 30: Postulierter anaerober Abbauweg von Alkenen durch Sulfatreduzierer.

Der vermutete aktivierende Schritt ist eine Hydratation der Doppelbindung, wobei der korrespondierende 1-Alkohol entsteht. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, könnte dabei ein Acetylenhydratase-ähnliches Enzym sein, da dieses Enzym einen Mechanismus aufweist, der zur Bildung von 1-Alkoholen führen würde. Der 1-Alkohol wird dann durch eine Alkoholdehydrogenase zum Aldehyd oxidiert, welches durch eine mögliche Aldehydoxidoreduktase zur entsprechenden Fettsäure umgesetzt werden kann. Bei der initialen Reaktion der Alken-Hydratisierung würde es sich um eine ungewöhnliche anti-Markownikow Reaktion handeln. Die Markownikow-Regel bezieht sich auf die Addition von Halogenwasserstoffen an die Doppelbindung asymmetrischer Alkene. Dabei wird normalerweise das Wasserstoffatom an das Kohlenstoffatom mit der höheren Anzahl an Wasserstoffatomen gebunden und das Halogen damit an das Kohlenstoffatom mit der geringeren Anzahl von H-Atomen. Das gilt auch für die Addition von Wasser. Dort wird ebenfalls das Wasserstoffatom an das Kohlenstoffatom gebunden, welches bereits eine höhere Anzahl an Wasserstoffatomen besitzt, und somit das niedriger substituierte

Kohlenstoffatom ist. Die Hydroxygruppe wird in Folge dessen an das höher substituierte Kohlenstoffatom mit weniger Wasserstoffatomen gebunden (Beller et al., 2004). Damit würde sich ein sekundärer Alkohol für die Hydratisierung von Hexadecen ergeben. In dieser Arbeit wird allerdings postuliert, dass ein primärer Alkohol entsteht und es sich somit um eine anti-Markownikow Reaktion handelt. Diese Hypothese liegt nahe, da andernfalls auch die Alkene in *D. oleovorans* Stamm Hxd3 über iso-Alkohole abgebaut werden würden, aber dagegen sprechen eindeutig die unterschiedlichen Fettsäuremuster mit Hexadecan bzw. Hexadecen als Substrat (siehe Abb. 8).

Wie im Kapitel 7.1 auf Seite 87 beschrieben, besitzt *D. oleovorans* einige Gene die für Enzyme kodieren, die Ähnlichkeiten zur Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus* aufweisen. Vier von diesen Genen wurden amplifiziert und drei von ihnen in einen *broad host range* Vektor kloniert und in den isolierten *P. stutzeri* Stamm K transformiert. Da dieser Stamm in der Lage ist auf 1-Hexadecanol zu wachsen, nicht jedoch auf Alkenen, sollte er mit dem eingebrachten Plasmid in der Lage sein, auf Hexadecen als Substrat zu wachsen. Wenn eines der Gene für das Enzym kodiert, welches für den initialen Schritt des anaeroben Alkenabbaus verantwortlich ist. Ein geringes Wachstum auf Hexadecen unter aeroben Bedingungen konnte mit zwei der transformierten Stämme (mit dem Plasmid pASG-wt1-MOB_Mpox1 und pASG-wt1-MOB_Mpox4) detektiert werden. Um ein letztendlich signifikantes Ergebnis im Hinblick auf das Wachstum zu erhalten, müsste dieser Versuch noch einmal mit mehreren Parallelen wiederholt werden, was aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Außerdem sollte bei gering auftretendem Wachstum die Kultur mehrmals weiter überimpft werden, damit die Zellen sich über einen längeren Zeitraum an das neue Substrat adaptieren können.

Die Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus* ist ein Wolfram Eisen-Schwefel Protein, das die Addition von Wasser an die Dreifachbindung von Acetylen katalysiert, wodurch das Acetaldehyd entsteht (Rosner and Schink, 1995). Um zu überprüfen, ob auch das Enzym des ersten Schrittes des anaeroben Alkenabbaus in *D. oleovorans* und *D. alkenivorans* von Wolfram abhängig ist, wurden Kulturen die möglichst kein Wolfram (W) enthielten (Nutzung neuer Kulturflaschen, Miliporewasser und Supplemente ohne W) mit Zellen beider Stämme angeimpft und das Wachstum beobachtet. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen Kulturen festgestellt werden, die mit oder ohne W wuchsen. Sowohl die Zellmassen, als auch die Wachstumsgeschwindigkeiten waren annähernd gleich. Da aber auch die Acetylenhydratase aus *P. acetylenicus* nur 0,4 mol W pro Mol Enzym benötigt (Rosner and Schink, 1995) wäre es möglich, dass trotz aller Maßnahmen, die ergriffen wurden, um möglichst kein W in den Kulturen zu haben, noch eine ausreichende Konzentration des Elementes vorhanden war. Dies wäre besonders in der ersten Kultur vorstellbar, die mit 10 % einer W enthaltenden Kultur angeimpft wurde. Doch auch nach weiteren

Überimpfungen von Kulturen ohne W, in neue Kulturen die kein W enthielten, war kein Unterschied im Wachstum zu sehen. In die Acetylenhydratase kann in Abwesenheit von Wolfram allerdings auch Molybdän eingebaut werden, was immer noch zu einem aktiven Enzym führt, welches aber in seiner spezifischen Aktivität beeinträchtigt ist. Eine postulierte Alkenhydratase ist deshalb nicht zwangsläufig von Wolfram abhängig und kann eventuell auch Molybdän im gleichen Maße nutzen.

Literaturverzeichnis

- Aeckersberg, F., F. Bak, and F. Widdel. 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of microbiology*. 156:5-14.
- Aeckersberg, F., F.A. Rainey, and F. Widdel. 1998. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch Microbiol*. 170:361-369.
- Beller, M., J. Seayad, A. Tillack, and H. Jiao. 2004. Katalytische Markownikow- und Anti-Markownikow-Funktionalisierung von Alkenen und Alkinen. *Angewandte Chemie*. 116:3448-3479.
- Biegert, T., G. Fuchs, and J. Heider. 1996. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur J Biochem*. 238:661-668.
- Blasco, F., C. Iobbi, G. Giordano, M. Chippaux, and V. Bonnefoy. 1989. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the nar operon and reassessment of the role of the alpha and beta subunits in iron binding and electron transfer. *Mol Gen Genet*. 218:249-256.
- Callaghan, A.V., L.M. Gieg, K.G. Kropp, J.M. Suflita, and L.Y. Young. 2006. Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol*. 72:4274-4282.
- Callaghan, A.V., B.E. Morris, I.A. Pereira, M.J. McInerney, R.N. Austin, J.T. Groves, J.J. Kukor, J.M. Suflita, L.Y. Young, G.J. Zylstra, and B. Wawrik. 2012. The genome sequence of *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01: a blueprint for anaerobic alkane oxidation. *Environ Microbiol*. 14:101-113.
- Callaghan, A.V., M. Tierney, C.D. Phelps, and L.Y. Young. 2009. Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Appl Environ Microbiol*. 75:1339-1344.
- Callaghan, A.V., B. Wawrik, S.M. Ni Chadhain, L.Y. Young, and G.J. Zylstra. 2008. Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 366:142-148.
- Cline, J.D. 1969. WILLIAM W. BROENKOW. *Anal. Chem*. 21:1005-1009.
- Cravo-Laureau, C., C. Labat, C. Joulain, R. Matheron, and A. Hirschler-Rea. 2007. *Desulfatiferula olefinivorans* gen. nov., sp. nov., a long-chain n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57:2699-2702.
- Cravo-Laureau, C., R. Matheron, J.-L. Cayol, C. Joulain, and A. Hirschler-Rea. 2004a. *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an n-alkane- and n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 54:77-83.
- Cravo-Laureau, C., R. Matheron, C. Joulain, J.L. Cayol, and A. Hirschler-Rea. 2004b. *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54:1639-1642.
- Davidova, I.A., L.M. Gieg, M. Nanny, K.G. Kropp, and J.M. Suflita. 2005. Stable isotopic studies of n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterial enrichment culture. *Appl Environ Microbiol*. 71:8174-8182.
- Dermer, J., and G. Fuchs. 2012. Molybdoenzyme that catalyzes the anaerobic hydroxylation of a tertiary carbon atom in the side chain of cholesterol. *J Biol Chem*. 287:36905-36916.
- Ensign, S.A. 1996. Aliphatic and chlorinated alkenes and epoxides as inducers of alkene monooxygenase and epoxidase activities in *Xanthobacter* strain Py2. *Applied and environmental microbiology*. 62:61-66.

- Ensign, S.A., M.R. Hyman, and D.J. Arp. 1992. Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylene-grown *Xanthobacter* strain. *Appl Environ Microbiol.* 58:3038-3046.
- Fourmond, V., B. Burlat, S. Dementin, P. Arnoux, M. Sabaty, S. Boiry, B. Guigliarelli, P. Bertrand, D. Pignol, and C. Leger. 2008. Major Mo(V) EPR signature of *Rhodobacter sphaeroides* periplasmic nitrate reductase arising from a dead-end species that activates upon reduction. Relation to other molybdoenzymes from the DMSO reductase family. *J Phys Chem B.* 112:15478-15486.
- Fox, B.G., J.G. Borneman, L.P. Wackett, and J.D. Lipscomb. 1990. Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: mechanistic and environmental implications. *Biochemistry.* 29:6419-6427.
- Fuchs, G., M. Boll, and J. Heider. 2011. Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol.* 9:803-816.
- Georg Fuchs, T.E., Johann Heider, B rries Kemper, Erika Kothe, Bernhard Schink, Erwin Schneider, Gottfried Uden. 2007. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Geyer, R., A.D. Peacock, A. Miltner, H.H. Richnow, D.C. White, K.L. Sublette, and M. Kastner. 2005. In situ assessment of biodegradation potential using biotrap amended with C-13-labeled benzene or toluene. *Environ Sci Technol.* 39:4983-4989.
- Gilewicz, M., G. Monpert, M. Acquaviva, G. Mille, and J.-C. Bertrand. 1991. Anaerobic oxidation of 1-n-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. *Applied microbiology and biotechnology.* 36:252-256.
- Grossi, V., C. Cravo-Laureau, A. M  ou, D. Raphel, F. Garzino, and A. Hirschler-R  a. 2007. Anaerobic 1-alkene metabolism by the alkane-and alkene-degrading sulfate reducer *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Applied and environmental microbiology.* 73:7882-7890.
- Grossi, V., C. Cravo-Laureau, J.-F. Rontani, M. Cros, and A. Hirschler-R  a. 2011. Anaerobic oxidation of n-alkenes by sulphate-reducing bacteria from the genus *Desulfatiferula*: n-ketones as potential metabolites. *Research in microbiology.* 162:915-922.
- Grundmann, O., A. Behrends, R. Rabus, J. Amann, T. Halder, J. Heider, and F. Widdel. 2008. Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of n-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. *Environ Microbiol.* 10:376-385.
- Guckert, J.B., C.P. Antworth, P.D. Nichols, and D.C. White. 1985. Phospholipid, Ester-Linked Fatty-Acid Profiles as Reproducible Assays for Changes in Prokaryotic Community Structure of Estuarine Sediments. *Fems Microbiol Ecol.* 31:147-158.
- Hakil, F., O. Amin-Ali, A. Hirschler-Rea, D. Mollex, V. Grossi, R. Duran, R. Matheron, and C. Cravo-Laureau. 2014. *Desulfatiferula berrensii* sp. nov., a n-alkene-degrading sulfate-reducing bacterium isolated from estuarine sediments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 64:540-544.
- Hamamura, N., R.T. Storfa, L. Semprini, and D.J. Arp. 1999. Diversity in butane monooxygenases among butane-grown bacteria. *Applied and environmental microbiology.* 65:4586-4593.
- Hanlon, S.P., T.H. Toh, P.S. Solomon, R.A. Holt, and A.G. McEwan. 1996. Dimethylsulfide:acceptor oxidoreductase from *Rhodobacter sulfidophilus*. The purified enzyme contains b-type haem and a pterin molybdenum cofactor. *Eur J Biochem.* 239:391-396.
- Harms, G., R. Rabus, and F. Widdel. 1999. Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon p-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch Microbiol.* 172:303-312.
- Heider, J., and K. Sch  hle. 2013. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. In *The Prokaryotes*. Springer. 605-634.
- Heider, J., M. Szaleniec, K. Sunwoldt, and M. Boll. 2016. Ethylbenzene Dehydrogenase and Related Molybdenum Enzymes Involved in Oxygen-Independent Alkyl Chain Hydroxylation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 26:45-62.

- Higuchi, Y., N. Yasuoka, M. Kakudo, Y. Katsube, T. Yagi, and H. Inokuchi. 1987. Single crystals of hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Journal of Biological Chemistry*. 262:2823-2825.
- Hille, R. 1996. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev*. 96:2757-2816.
- Hopper, D.J., I.D. Bossert, and M.E. Rhodes-Roberts. 1991. p-cresol methylhydroxylase from a denitrifying bacterium involved in anaerobic degradation of p-cresol. *J Bacteriol*. 173:1298-1301.
- Hou, C.T., R. Patel, A.I. Laskin, and N. Barnabe. 1979. Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: epoxidation of C2 to C4 n-alkenes by methylotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 38:127-134.
- Hou, C.T., R. Patel, A.I. Laskin, N. Barnabe, and I. Barist. 1983. Epoxidation of short-chain alkenes by resting-cell suspensions of propane-grown bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 46:171-177.
- Hunte, C., H. Palsdottir, and B.L. Trumpower. 2003. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc 1 complex. *FEBS letters*. 545:39-46.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28.
- Johnson, H.A., D.A. Pelletier, and A.M. Spormann. 2001. Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J Bacteriol*. 183:4536-4542.
- Johnson, H.A., and A.M. Spormann. 1999. In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization. *J Bacteriol*. 181:5662-5668.
- Khelifi, N., V. Grossi, M. Hamdi, A. Dolla, J.L. Tholozan, B. Ollivier, and A. Hirschler-Rea. 2010. Anaerobic oxidation of fatty acids and alkenes by the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol*. 76:3057-3060.
- Kloer, D.P., C. Hagel, J. Heider, and G.E. Schulz. 2006. Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Structure*. 14:1377-1388.
- Knack, D., C. Hagel, M. Szaleniec, A. Dudzik, A. Salwinski, and J. Heider. 2012. Substrate and inhibitor spectra of ethylbenzene dehydrogenase: perspectives on application potential and catalytic mechanism. *Applied and environmental microbiology*. 78:6475-6482.
- Knack, D.H., J.L. Marshall, G.P. Harlow, A. Dudzik, M. Szaleniec, S.Y. Liu, and J. Heider. 2013. BN/CC Isosteric Compounds as Enzyme Inhibitors: N-and B-Ethyl-1, 2-azaborine Inhibit Ethylbenzene Hydroxylation as Nonconvertible Substrate Analogues. *Angewandte Chemie International Edition*. 52:2599-2601.
- Kniemeyer, O., and J. Heider. 2001. Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J Biol Chem*. 276:21381-21386.
- Kucera, I., R. Hedbávný, and V. Dadák. 1988. Separate binding sites for antimycin and mucidin in the respiratory chain of the bacterium *Paracoccus denitrificans* and their occurrence in other denitrificans bacteria. *Biochemical Journal*. 252:905-908.
- Kutoh, E., and N. Sone. 1988. Quinol-cytochrome c oxidoreductase from the thermophilic bacterium PS3. Purification and properties of a cytochrome bc1 (b6f) complex. *Journal of Biological Chemistry*. 263:9020-9026.
- Leuthner, B., and J. Heider. 2000. Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs operon codes for enzymes of β oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *Journal of bacteriology*. 182:272-277.
- Leuthner, B., C. Leutwein, H. Schulz, P. Horth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schagger, and J. Heider. 1998. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol*. 28:615-628.
- Leutwein, C. 2000. Biochemische Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel.
- Ljungdahl, P.O., J.D. Pennoyer, D.E. Robertson, and B.L. Trumpower. 1987. Purification of highly active cytochrome bc1 complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 891:227-241.

- Maeng, J.H., Y. Sakai, Y. Tani, and N. Kato. 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J Bacteriol.* 178:3695-3700.
- Matias, P.M., R. Coelho, I.A. Pereira, A.V. Coelho, A.W. Thompson, L.C. Sieker, J. Le Gall, and M.A. Carrondo. 1999a. The primary and three-dimensional structures of a nine-haem cytochrome c from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 reveal a new member of the Hmc family. *Structure.* 7:119-130.
- Matias, P.M., L.M. Saraiva, C.M. Soares, A.V. Coelho, J. LeGall, and M.A. Carrondo. 1999b. Nine-haem cytochrome c from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: primary sequence determination, crystallographic refinement at 1.8 and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c 3. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 4:478-494.
- Mattes, T.E., A.K. Alexander, and N.V. Coleman. 2010. Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 34:445-475.
- McDevitt, C.A., P. Hugenholtz, G.R. Hanson, and A.G. McEwan. 2002. Molecular analysis of dimethyl sulphide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*: its place in the dimethyl sulphoxide reductase family of microbial molybdopterin-containing enzymes. *Mol Microbiol.* 44:1575-1587.
- McDonald, I.R., C.B. Miguez, G. Rogge, D. Bourque, K.D. Wendlandt, D. Groleau, and J.C. Murrell. 2006. Diversity of soluble methane monooxygenase-containing methanotrophs isolated from polluted environments. *FEMS Microbiol Lett.* 255:225-232.
- Pereira, I.A., I. Pacheco, M.Y. Liu, J. Legall, A.V. Xavier, and M. Teixeira. 1997. Multiheme cytochromes from the sulfur-reducing bacterium *Desulfuromonas acetoxidans*. *Eur J Biochem.* 248:323-328.
- Pereira, I.A., A.R. Ramos, F. Grein, M.C. Marques, S.M. da Silva, and S.S. Venceslau. 2011. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. *Front Microbiol.* 2:69.
- Pereira, M.M., J.N. Carita, and M. Teixeira. 1999a. Membrane-bound electron transfer chain of the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*: a novel multihemic cytochrome bc, a new complex III. *Biochemistry.* 38:1268-1275.
- Pereira, M.M., J.N. Carita, and M. Teixeira. 1999b. Membrane-bound electron transfer chain of the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*: characterization of the iron-sulfur centers from the dehydrogenases and investigation of the high-potential iron-sulfur protein function by in vitro reconstitution of the respiratory chain. *Biochemistry.* 38:1276-1283.
- Peters, F., D. Heintz, J. Johannes, A. van Dorselaer, and M. Boll. 2007. Genes, enzymes, and regulation of para-cresol metabolism in *Geobacter metallireducens*. *J Bacteriol.* 189:4729-4738.
- Rabus, R., M. Kube, A. Beck, F. Widdel, and R. Reinhardt. 2002. Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol.* 178:506-516.
- Rabus, R., M. Kube, J. Heider, A. Beck, K. Heitmann, F. Widdel, and R. Reinhardt. 2005. The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol.* 183:27-36.
- Rabus, R., and F. Widdel. 1995. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol.* 163:96-103.
- Rabus, R., H. Wilkes, A. Behrends, A. Armstroff, T. Fischer, A.J. Pierik, and F. Widdel. 2001. Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. *J Bacteriol.* 183:1707-1715.
- Rojo, F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental microbiology.* 11:2477-2490.
- Rosner, B.M., and B. Schink. 1995. Purification and characterization of acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*, a tungsten iron-sulfur protein. *J Bacteriol.* 177:5767-5772.

- Schink, B. 1985. Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiology Ecology*. 1:69-77.
- Schroder, I., S. Rech, T. Krafft, and J.M. Macy. 1997. Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J Biol Chem*. 272:23765-23768.
- Small, F.J., and S.A. Ensign. 1995. Carbon dioxide fixation in the metabolism of propylene and propylene oxide by *Xanthobacter* strain Py2. *J Bacteriol*. 177:6170-6175.
- Small, F.J., and S.A. Ensign. 1997. Alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2. Purification and characterization of a four-component system central to the bacterial metabolism of aliphatic alkenes. *J Biol Chem*. 272:24913-24920.
- So, C.M., C.D. Phelps, and L.Y. Young. 2003. Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Appl Environ Microbiol*. 69:3892-3900.
- So, C.M., and L.Y. Young. 1999a. Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Appl Environ Microbiol*. 65:5532-5540.
- So, C.M., and L.Y. Young. 1999b. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl Environ Microbiol*. 65:2969-2976.
- Strijkstra, A., K. Trautwein, R. Jarling, L. Wohlbrand, M. Dorries, R. Reinhardt, M. Drozdowska, B.T. Golding, H. Wilkes, and R. Rabus. 2014. Anaerobic activation of p-cymene in denitrifying betaproteobacteria: methyl group hydroxylation versus addition to fumarate. *Appl Environ Microbiol*. 80:7592-7603.
- Szaleniec, M., C. Hagel, M. Menke, P. Nowak, M. Witko, and J. Heider. 2007. Kinetics and mechanism of oxygen-independent hydrocarbon hydroxylation by ethylbenzene dehydrogenase. *Biochemistry*. 46:7637-7646.
- Tenbrink, F., B. Schink, and P.M. Kroneck. 2011. Exploring the active site of the tungsten, iron-sulfur enzyme acetylene hydratase. *J Bacteriol*. 193:1229-1236.
- Trumpower, B.L. 1990. Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiological reviews*. 54:101-129.
- Van Beilen, J.B., and E.G. Funhoff. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied microbiology and biotechnology*. 74:13-21.
- van Beilen, J.B., E.G. Funhoff, A. van Loon, A. Just, L. Kaysser, M. Bouza, R. Holtackers, M. Röthlisberger, Z. Li, and B. Witholt. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:59-65.
- Van Beilen, J.B., Z. Li, W.A. Duetz, T.H. Smits, and B. Witholt. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & gas science and technology*. 58:427-440.
- Weiner, J.H., D.P. MacIsaac, R.E. Bishop, and P.T. Bilous. 1988. Purification and properties of *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase, an iron-sulfur molybdoenzyme with broad substrate specificity. *J Bacteriol*. 170:1505-1510.
- Wilkes, H., R. Rabus, T. Fischer, A. Armstroff, A. Behrends, and F. Widdel. 2002. Anaerobic degradation of n-hexane in a denitrifying bacterium: further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via C-skeleton rearrangement. *Arch Microbiol*. 177:235-243.
- Woodcock, D., P. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. Smith, M. Michael, and M. Graham. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic acids research*. 17:3469-3478.
- Yang, X., and B. Trumpower. 1986. Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry*. 261:12282-12289.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*. 33:103-119.

- Yu, L., Q.-C. Mei, and C.-A. Yu. 1984. Characterization of purified cytochrome b-c1 complex from *Rhodopseudomonas sphaeroides* R-26. *Journal of Biological Chemistry*. 259:5752-5760.
- Zinoni, F., A. Birkmann, W. Leinfelder, and A. Böck. 1987. Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84:3156-3160.

Anhang

Leibniz-Institut
DSMZ-Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



Identifizierung des Stammes ‚Pseudomonas sp.‘
(DSM ID 15-559)

17. September 2015

Pseudomonas stutzeri

Eigenschaften des Stammes

Zellform	Stäbchen
Breite μm	0.7-0.8
Länge μm	1.5-2.5

ERGEBNIS: Stamm ‚Pseudomonas sp.‘
= *Pseudomonas stutzeri*

Gram-Reaktion	-
Lyse durch 3% KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Oxidase	+
Katalase	+

Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch
für *Pseudomonas stutzeri*.

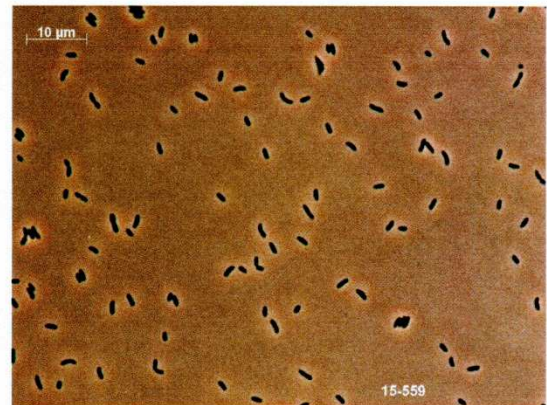
Hydrolyse von Gelatine	-
Esculin	-
Stärke	+

Die partielle Sequenzierung der 16SrDNA
ergab eine Zuordnung von bis zu 99,6% zu
verschiedenen Stämmen der Spezies
Pseudomonas stutzeri.

Wachstum bei 41°C	w
Wachstum bei 42°C	-

Die physiologischen Tests bestätigen dieses
Ergebnis weitestgehend.

Substratverwertung	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannose	-
Mannitol	-
Malat	+
Citrat	+
Caprat	+
Gluconat	-
Trehalose	-
Azelat	w
Geraniol	-



ADH	-
-----	---

Urease	-
--------	---

Fluoreszens	-
Pyocyanin	-

Beweglichkeit	+
---------------	---

E159034.17A [32369] UN-V-15-559a-PSMN-MARBURG(FS,1d,28C)

Page 1

Volume: DATA File: E159034.17A Samp Ctr: 6 ID Number: 32369
 Type: Samp Bottle: 13 Method: TSBA40
 Created: 9/3/2015 12:02:05 PM
 Sample ID: UN-V-15-559a-PSMN-MARBURG(FS,1d,28C)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.574	3.758E+8	0.024	----	7.040	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.926	289	0.023	----	7.817		----	< min rt	
2.436	618	0.025	----	8.944		----	< min rt	
2.914	585	0.023	1.170	10.001	10:0	0.18	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
3.207	168	0.025	----	10.468		----		
3.899	9019	0.026	1.084	11.424	10:0 3OH	2.54	ECL deviates 0.002	
4.214	426	0.023	1.065	11.798	unknown 11.799	0.12	ECL deviates -0.001	
4.385	29809	0.028	1.056	12.001	12:0	8.17	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
4.481	336	0.028	1.052	12.091	11:0 ISO 3OH	0.09	ECL deviates 0.002	
4.905	494	0.029	1.035	12.487	unknown 12.484	0.13	ECL deviates 0.003	
5.038	370	0.027	1.030	12.612	13:0 ISO	0.10	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
5.690	529	0.029	1.009	13.184	12:0 2OH	0.14	ECL deviates 0.007	
6.041	11632	0.033	1.000	13.455	12:0 3OH	3.02	ECL deviates 0.001	
6.503	432	0.032	----	13.813		----		
6.745	3159	0.034	0.984	14.000	14:0	0.81	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
9.536	134408	0.040	0.946	15.819	Sum In Feature 3	33.01	ECL deviates -0.003	16:1 w7c/15 iso 2OH
9.830	71660	0.037	0.943	16.001	16:0	17.55	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
10.894	1514	0.040	0.935	16.631	17:0 ISO	0.37	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
11.329	3144	0.041	0.933	16.888	17:0 CYCLO	0.76	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
12.948	133961	0.042	0.925	17.824	18:1 w7c	32.16	ECL deviates 0.001	
13.252	1103	0.039	0.924	18.000	18:0	0.26	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
13.388	467	0.038	0.923	18.078	11 methyl 18:1 w7c	0.11	ECL deviates -0.003	
14.815	2029	0.043	0.919	18.902	19:0 CYCLO w8c	0.48	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
----	134408	----	----	----	Summed Feature 3	33.01	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.002

Reference ECL Shift: 0.003

Number Reference Peaks: 9

Total Response: 405244

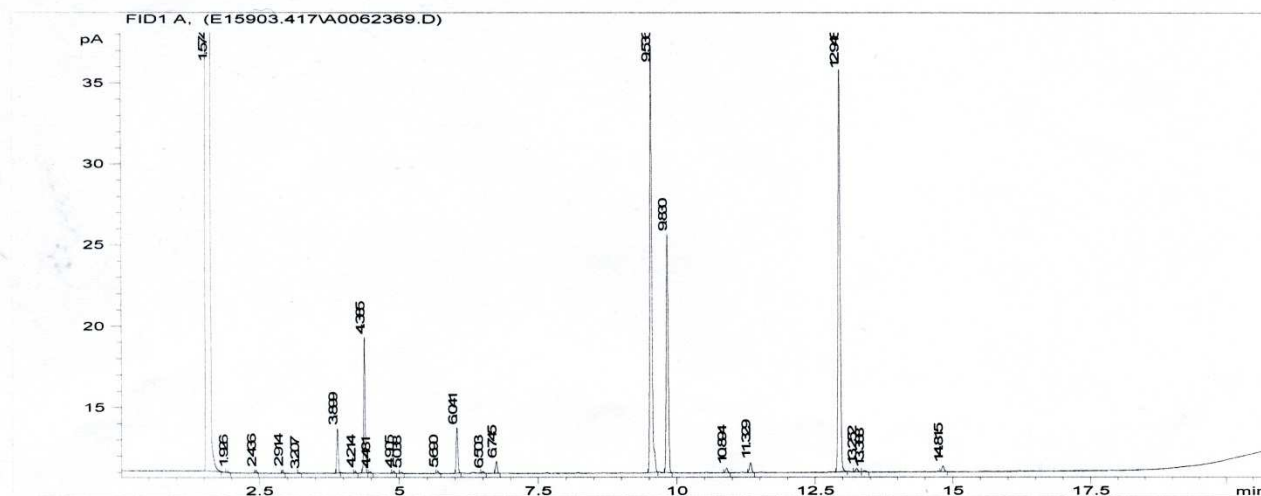
Total Named: 404644

Percent Named: 99.85%

Total Amount: 385198

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.833	Pseudomonas-stutzeri* (includes P. perfectomarina)
	0.788	Pseudomonas-balearica**
	0.462	Neisseria-mucosa*



E159034.17A [32370] UN-V-15-559b-PSMN-MARBURG(FS,1d,28C)

Page 1

Volume: DATA File: E159034.17A Samp Ctr: 7 ID Number: 32370
 Type: Samp Bottle: 14 Method: TSBA40
 Created: 9/3/2015 12:26:40 PM
 Sample ID: UN-V-15-559b-PSMN-MARBURG(FS,1d,28C)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.573	3.745E+8	0.025	----	7.039	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.925	342	0.028	----	7.816		----	< min rt	
2.437	539	0.025	----	8.946		----	< min rt	
2.914	689	0.023	1.170	10.000	10:0	0.18	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
3.899	10599	0.026	1.084	11.424	10:0 3OH	2.61	ECL deviates 0.002	
4.214	562	0.028	1.065	11.798	unknown 11.799	0.14	ECL deviates -0.001	
4.385	34142	0.028	1.056	12.001	12:0	8.20	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
4.482	446	0.027	1.052	12.092	11:0 ISO 3OH	0.11	ECL deviates 0.003	
4.905	524	0.030	1.035	12.487	unknown 12.484	0.12	ECL deviates 0.003	
5.039	388	0.029	1.030	12.612	13:0 ISO	0.09	ECL deviates -0.002	Reference -0.004
5.689	565	0.031	1.009	13.182	12:0 2OH	0.13	ECL deviates 0.005	
6.041	13441	0.032	1.000	13.455	12:0 3OH	3.06	ECL deviates 0.001	
6.505	560	0.036	----	13.814		----		
6.745	3684	0.033	0.984	14.001	14:0	0.82	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
9.536	155456	0.040	0.946	15.818	Sum In Feature 3	33.46	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/15 iso 2OH
9.679	423	0.043	0.945	15.907	16:1 w5c	0.09	ECL deviates -0.002	
9.829	80861	0.038	0.943	16.001	16:0	17.36	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
10.893	1738	0.040	0.935	16.630	17:0 ISO	0.37	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
11.330	3250	0.041	0.933	16.889	17:0 CYCLO	0.69	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
12.945	151413	0.044	0.925	17.823	18:1 w7c	31.86	ECL deviates 0.000	
13.250	1194	0.038	0.924	17.998	18:0	0.25	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
14.816	2118	0.047	0.919	18.903	19:0 CYCLO w8c	0.44	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
----	155456	---	----	----	Summed Feature 3	33.46	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.002

Reference ECL Shift: 0.003

Number Reference Peaks: 9

Total Response: 462053

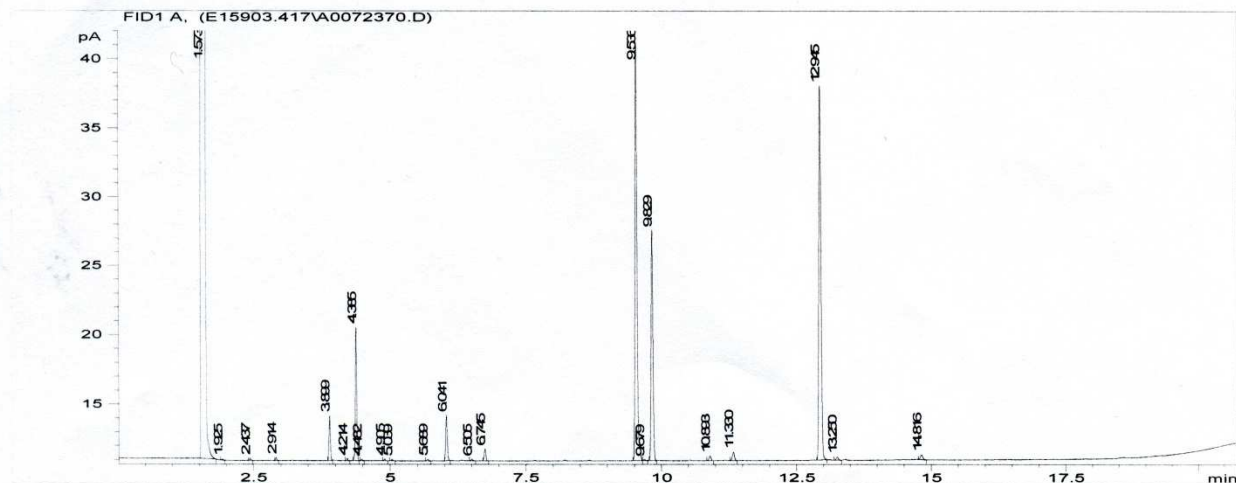
Total Named: 461493

Percent Named: 99.88%

Total Amount: 439453

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.820	Pseudomonas-stutzeri* (includes P. perfectomarina)
	0.753	Pseudomonas-balearica**
	0.457	Neisseria-mucosa*



Tab. 10: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der α -Untereinheit der Alkanhydroxylase (Bande a der SDS-PAGE)

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteine	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(2,9)
Molybdopterinioxidoreduktase [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	35,05	4	21	37	45	1611,15
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
YPVIDPSGPDFNPR	1	1	1	WP_012173623		1573,76404
GASYSLQMYNPDR	1	1	1	WP_012173623	M8(Oxidation)	1517,66817
LPCDPALEGVYK	2	1	1	WP_012173623	C3(Carbamidomethyl)	1361,67688
GVEDGDLVR	1	1	1	WP_012173623		959,47882
VFNDFASFK	3	1	1	WP_012173623		1074,52593
IPSYHFISEAR	1	1	1	WP_012173623		1319,67451
FLSAADIEK	1	2	1	WP_012173623		993,52485
KVPYPTYNR	1	1	1	WP_012173623		1137,60495
EQSDLPLLLVR	3	1	1	WP_012173623		1169,65263
GNVEISK	1	3	1	WP_012173623		746,40399
DQTPTVYCWMGTNPAR	1	1	1	WP_012173623	C8(Carbamidomethyl); M10(Oxidation)	1912,83025
ALLDSEYTPEQASEMCR	1	1	1	WP_012173623	M15(Oxidation); C16(Carbamidomethyl)	2015,86706
WSIHSIWVSNEQLLR	1	1	1	WP_012173623		1867,99637
LHDWQLMGSSGK	1	1	1	WP_012173623	M7(Oxidation)	1374,64617
YAGWENLHR	1	1	1	WP_012173623		1145,54807
EDPTISDEMASEIK	1	1	1	WP_012173623	M9(Oxidation)	1451,65509
SYDIAIPGMIK	1	1	1	WP_012173623	M9(Oxidation)	1223,63413
GISVNVEK	1	1	1	WP_012173623		845,47230
EHGIVR	1	1	1	WP_012173623		710,39413
GIYETFGK	1	1	1	WP_012173623		914,46184
APLETLK	1	1	1	WP_012173623		771,46069
TNFVPR	2	2	1	WP_012173623		733,39868
VPYPTYNR	2	1	1	WP_012173623		1009,51026
TNPDTIR	1	1	1	WP_012173623		816,42063

DDQFCFWDSK	1	1	1	WP_012173623	C5(Carbamidomethyl)	1347,53056
TVEPEPVFNK	2	1	1	WP_012173623		1161,61478
IGGNYPLR	1	1	1	WP_012173623		889,48806
ATLLDGK	1	1	1	WP_012173623		717,41395
TPVQEEYMPFLNQFSVR	1	1	1	WP_012173623	M8(Oxidation)	2101,00640
IFEDWK	1	1	1	WP_012173623		837,41441
DGVVFR	1	1	1	WP_012173623		692,37207
WNWCAQPDR	1	1	1	WP_012173623	C4(Carbamidomethyl)	1345,61040
VWESFK	1	1	1	WP_012173623		795,40332
QLPLMR	1	1	1	WP_012173623	M5(Oxidation)	773,43353
YYHGDlier	1	1	1	WP_012173623		1165,56295
WVDYPFVK	1	1	1	WP_012173623		1053,54020
EELPVHK	1	1	1	WP_012173623		851,46191

Tab. 11: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der β -Untereinheit der Alkanhydroxylase (Bande b der SDS-PAGE)

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteine	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(2,9)
respiratorische Nitratreduktase beta Untereinheit [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	17,22	1	2	5	6	181,11
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
ELAAAFEETK	1	1	1	WP_012173625		1108,55083
ICNHCAYPACVDACPR	2	1	1	WP_012173626	C2(Carbamidomethyl); C5(Carbamidomethyl); C10(Carbamidomethyl); C14(Carbamidomethyl)	1963,80265
VALPLHAEYGTNPVIFYVPPLAPHR	1	1	1	WP_012173627		2772,46206
FCLEACPYK	1	1	1	WP_012173628	C2(Carbamidomethyl); C6(Carbamidomethyl)	1187,52126
CIFCYPR	1	1	1	WP_012173629	C1(Carbamidomethyl); C4(Carbamidomethyl)	1015,44760

Tab. 12: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der γ -Untereinheit der Alkanhydroxylase (Bande c der SDS-PAGE)

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteine	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(2,9)
gamma-Untereinheit der Ethylbenzaldehydrogenase [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	38,91	1	4	6	8	283,36
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
ELLNCDSSVWQSGK	1	1	1	WP_012173624	C5(Carbamidomethyl)	1622,74694
NQVSHGLSTSLYTEK	2	1	1	WP_012173624		1663,82872
DIVFYCEWESGKPNK	2	1	1	WP_012173624	C6(Carbamidomethyl)	1871,86052
AVLETAATPLANQSPYIK	1	1	1	WP_012173624		1984,07442
SSISSYSR	1	1	1	WP_012173624		886,42641
ATQPGEETVDLMPGK	1	1	1	WP_012173624	M12(Oxidation)	1588,75000

Tab. 13: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/ Peptide der Bande d der SDS-PAGE

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteine	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(7,8)
AMP-unabhängige Synthetase und Ligase [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	6,16	1	2	3	3	90,00
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppe	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
MVNGPTEVNYYGK	1	1	1	WP_012174893	M1(Oxidation)	1487,68364
KLPAVISER	1	1	1	WP_012174893		1012,61498
SGNIEDLSIFK	1	1	1	WP_012174893		1222,63188
acyl-CoA Dehydrogenase domain-containing protein [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	3,35	1	1	2	2	
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppe	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
LLPNFFFNPK	1	1	1	WP_012176536		1236,67851
IFETLFLPK	1	1	1	WP_012176536		1107,64861
FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase [Desulfococcus oleovorans Hxd3]	1,75	1	1	1	1	53,25
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppe	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
LVLATGTTPR	1	1	1	WP_012174480		1028,61052

Tab. 14: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/Peptide der Bande e der SDS-PAGE

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteins	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(7,8)
ATP-Synthase Untereinheit alpha [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	18,02	563	8	9	19	282,85
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
VVDTTGAPIDGK	2	1	1	WP_012174030		1172,61711
IAQVPVGEAVLGR	2	2	1	WP_012174030		1308,76396
TAVAIDAILAQK	2	11	1	WP_012174030		1213,71636
IEVVAPGVIAR	2	3	1	WP_012174030		1123,68425
YPQVFADLK	4	1	1	WP_012174030		1080,57244
HALIYDDLK	2	551	1	WP_012174030		1287,69426
RIEVVAPGVIAR	2	1	1	WP_012174030		1279,78508
VVDTTGAPIDGKGPINASETR	2	1	1	WP_012174030		2098,08048
EAYPGDIFYNHSR	1	3	1	WP_012174030		1568,71404
Acetyl-CoA Acetyltransferase [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	9,09	1	2	4	4	93,38
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
FFGWGLSSNR	1	1	1	WP_012174896		1170,570482
YIAFPYTK	1	1	1	WP_012174896		1002,53032
AFLHVPVIVGAGQVTR	1	1	1	WP_012174896		1663,96561
ATVETYTVVYDR	1	1	1	WP_012174896		1416,70049
hypothetisches Protein Dole_1025 [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	1,96	1	1	1	1	78,73
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
IALSGPADVR	1	1	1	WP_012174453		998,56359

Tab. 15: MALDI-TOF Daten der identifizierten Peptide der ATP-abhängigen Acyl-CoA Ligase (Bande f der SDS-PAGE)

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteine	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(7,8)
ATP-abhängige Acyl-CoA Ligase [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	13,25	1	1	7	7	216,36
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
VLEEQFDPNAPNVIR	1	1	1	WP_012174893		1740,89067
ADISDVPVGVLYK	1	1	1	WP_012174893		1474,81536
VISAGTPR	1	1	1	WP_012174893		800,46227
AIWEDFEKR	1	1	1	WP_012174893		1193,59062
QTCLAELER	1	1	1	WP_012174893	C3(Carbamidomethyl)	1119,54668
SNIWDICR	1	1	1	WP_012174893	C7(Carbamidomethyl)	1063,49907
TVDVEGVK	1	1	1	WP_012174893		846,45702

Tab. 16: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/Peptide der Bande g der SDS-PAGE

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteine	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(7,8)
Heterodisulfidreduktase Untereinheit A [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	4,11	1	2	3	3	110,18
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
SVVFIQSPGK	1	1	1	WP_012174428		1061,60002
TPGLAENFYK	1	1	1	WP_012174428		1139,57329
SGALGGFAAQMR	1	1	1	WP_012174428	M11(Oxidation)	1181,57195

Tab. 17: MALDI-TOF Daten der identifizierten Proteine/Peptide der Bande h der SDS-PAGE

Beschreibung	Σ Übereinstimmung	Σ # Proteine	Σ # einzigartige Peptide	Σ # Peptide	Σ # PSMs	Score A(7,8)
ATP-Synthase Untereinheit alpha [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	21,19	616	8	10	27	322,90
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
IAQVPVGEAVLGR	2	2	1	WP_012174030		1308,76433
TAVAIDAILAQK	2	11	1	WP_012174030		1213,71453
HALIYDDLSK	2	551	1	WP_012174030		1287,69390
IEVVAPGVIAR	2	3	1	WP_012174030		1123,68450
YPQVFADLK	5	1	1	WP_012174030		1080,57268
AVDAMTPVGR	2	15	1	WP_012174030		1016,51763
EAYPGDIFYNHSR	4	3	1	WP_012174030		1568,71360
IAQVPVGEAVLGR	2	2	1	WP_012174030	Q3(deaminiert)	1309,74639
QVSLLLR	1	46	1	WP_012174030		828,53088
VVDTTGAPIDGKGPINASETR	1	1	1	WP_012174030		2098,07077
Heterodisulfidreduktase Untereinheit A [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	4,37	1	2	3	3	90,68
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
SVVFIQSPGK	1	1	1	WP_012174428		1061,59917
TPGLAENFYK	1	1	1	WP_012174428		1139,57317
FGSVILAAGWRPAK	1	1	1	WP_012174428		1472,83794
Hypothetisches Protein Dole_1025 [<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3]	1,96	1	1	1	1	72,61
Sequenz	# PSMs	# Proteine	# Protein Gruppen	Protein Gruppen Accessionnr.	Modifikationen	MH+ [Da]
IALSGPADVR	1	1	1	WP_012174453		998,56346

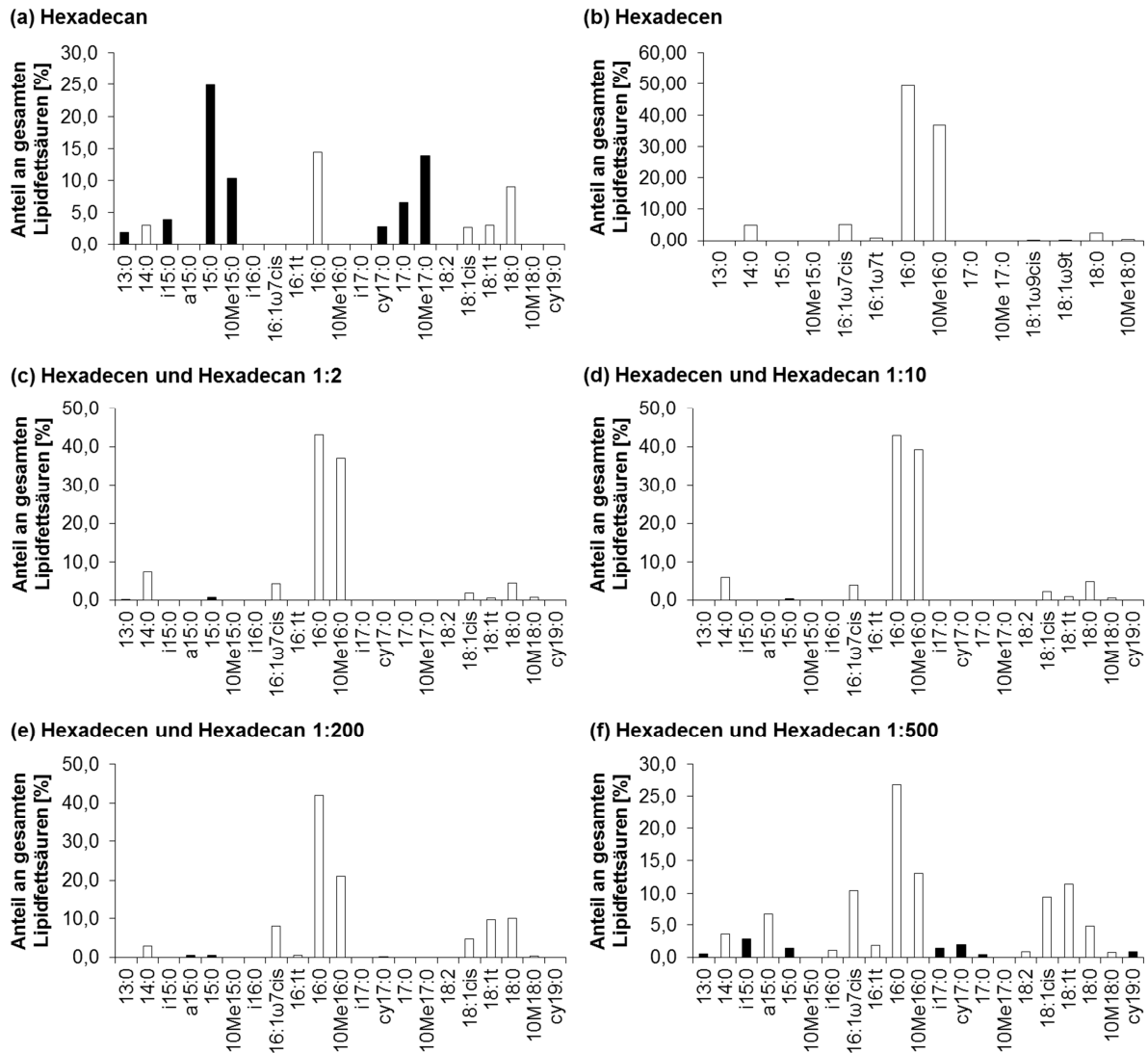
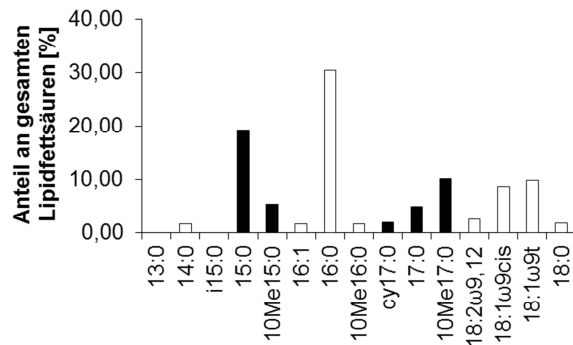
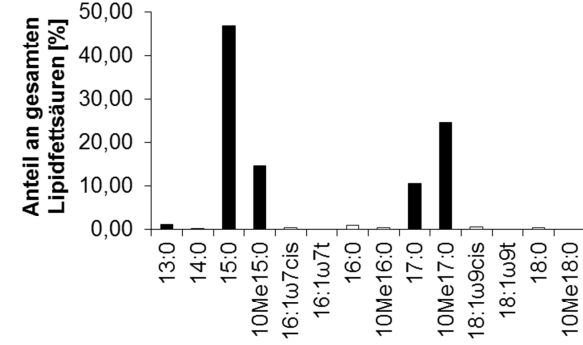


Abb. 31: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in *D. oleovorans* gewachsen auf Hexadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen. Das Fettsäuremuster der Zellen gewachsen auf Hexadecan (a), Hexadecen (b) und auf beiden Substraten in den Mischverhältnissen 1:2 (c), 1:10 (d), 1:200 (e) und 1:500 (f). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl. i: iso, t: trans, cy: cyclisch, Me: methyliert, ω9: Doppelbindung in der omega-9 Position, ω7: Doppelbindung in der omega-7 Position

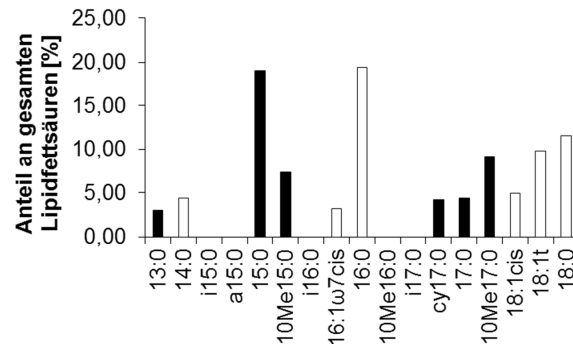
(a) Heptadecan



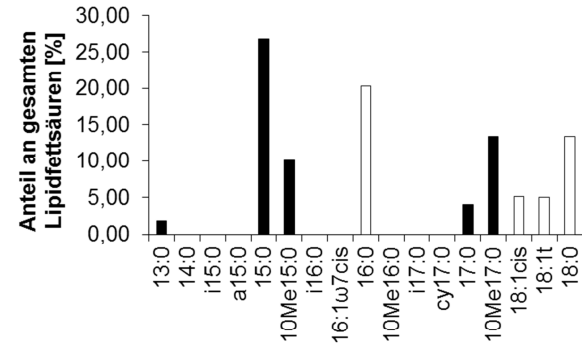
(b) 2-Hexadecanol



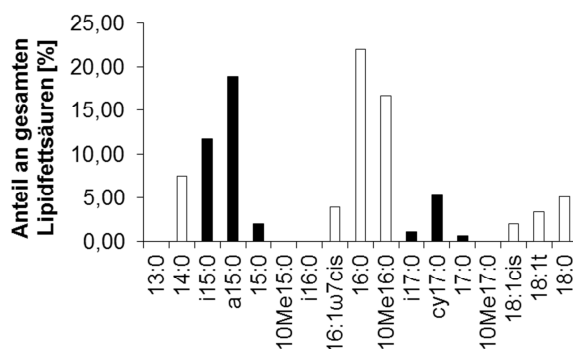
(c) 2-Hexadecanol und Heptadecan 1:10



(d) 2-Hexadecanol und Heptadecan 1:500



(e) 2-Hexadecanol und Heptadecan 1:1000



(f) 2-Hexadecanol und Heptadecan 1:2000

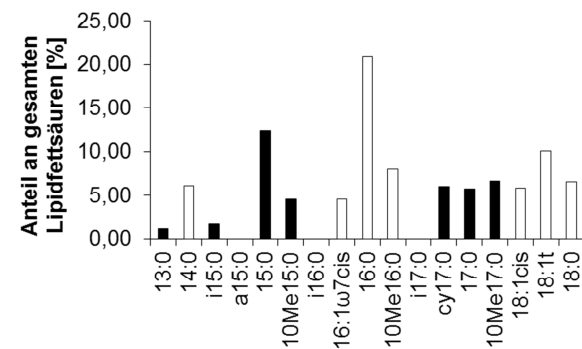
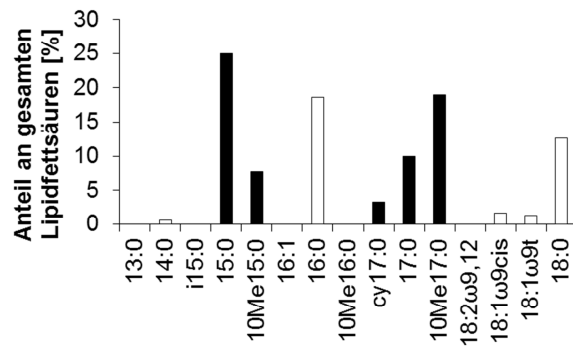
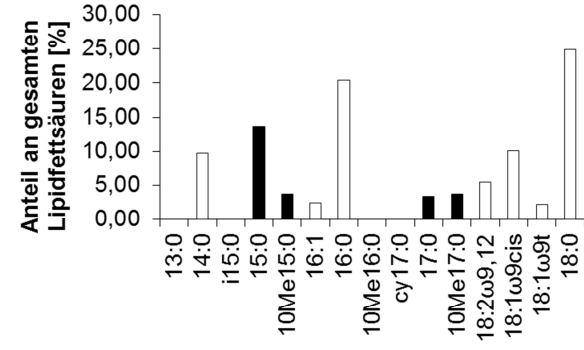


Abb. 32: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in *D. oleovorans* gewachsen auf Heptadecan, 2-Hexadecanol und auf beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen. Fettsäuremuster der Zellen gewachsen auf Heptadecan (a), 2-Hexadecanol (b) und auf beiden Substraten in den Mischverhältnissen 1:10 (c), 1:500 (d), 1:1000 (e) und 1:2000 (f). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl. i: iso, a: anteiso, t: trans, cy: cyclisch, Me: methyliert

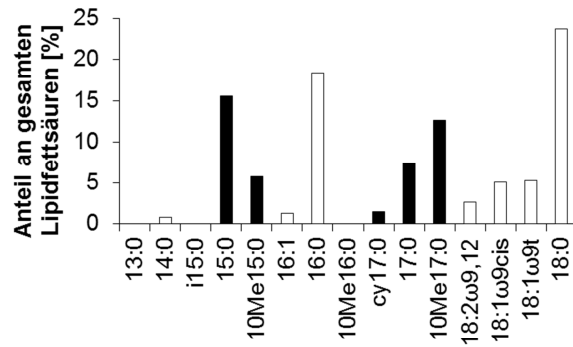
(a) Hexadecan



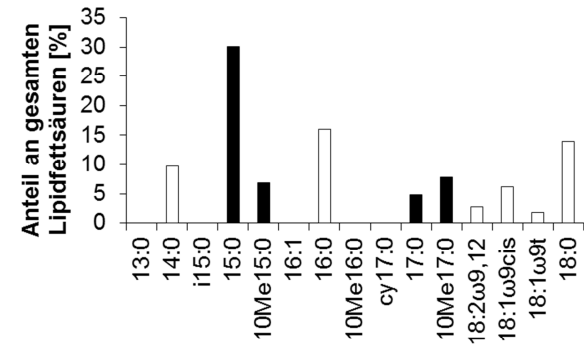
(b) 2-Tridecanol



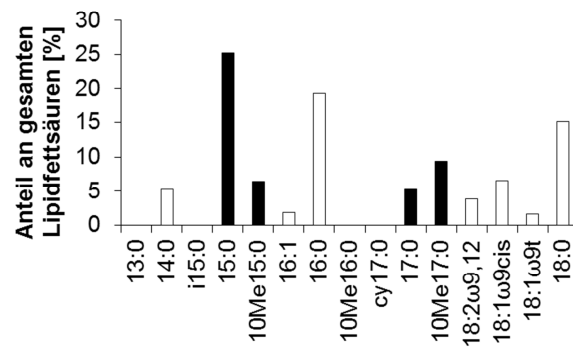
(c) 2-Tridecanol und Hexadecan 1:2



(d) 2-Tridecanol und Hexadecan 1:10



(e) 2-Tridecanol und Hexadecan 1:50



(f) 2-Tridecanol und Hexadecan 1:100

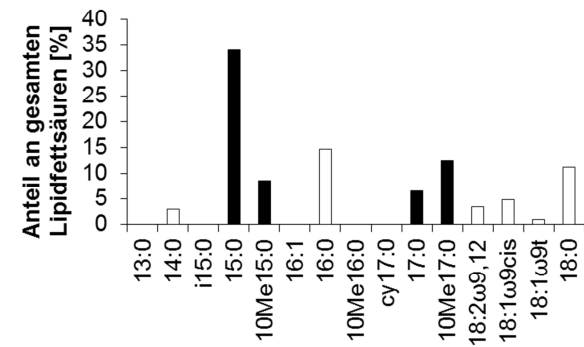


Abb. 33: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in Zellen von *D. oleovorans* gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen. Fettsäuremuster der Zellen auf Hexadecan (a), 2-Tridecanol (b) und auf beiden Substraten in den Mischverhältnissen 1:2 (c), 1:10 (d), 1:50 (e) und 1:100 (f). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl. i: iso, t: trans, cy: cyclisch, Me: methyliert, ω9: Doppelbindung in der omega-9 Position

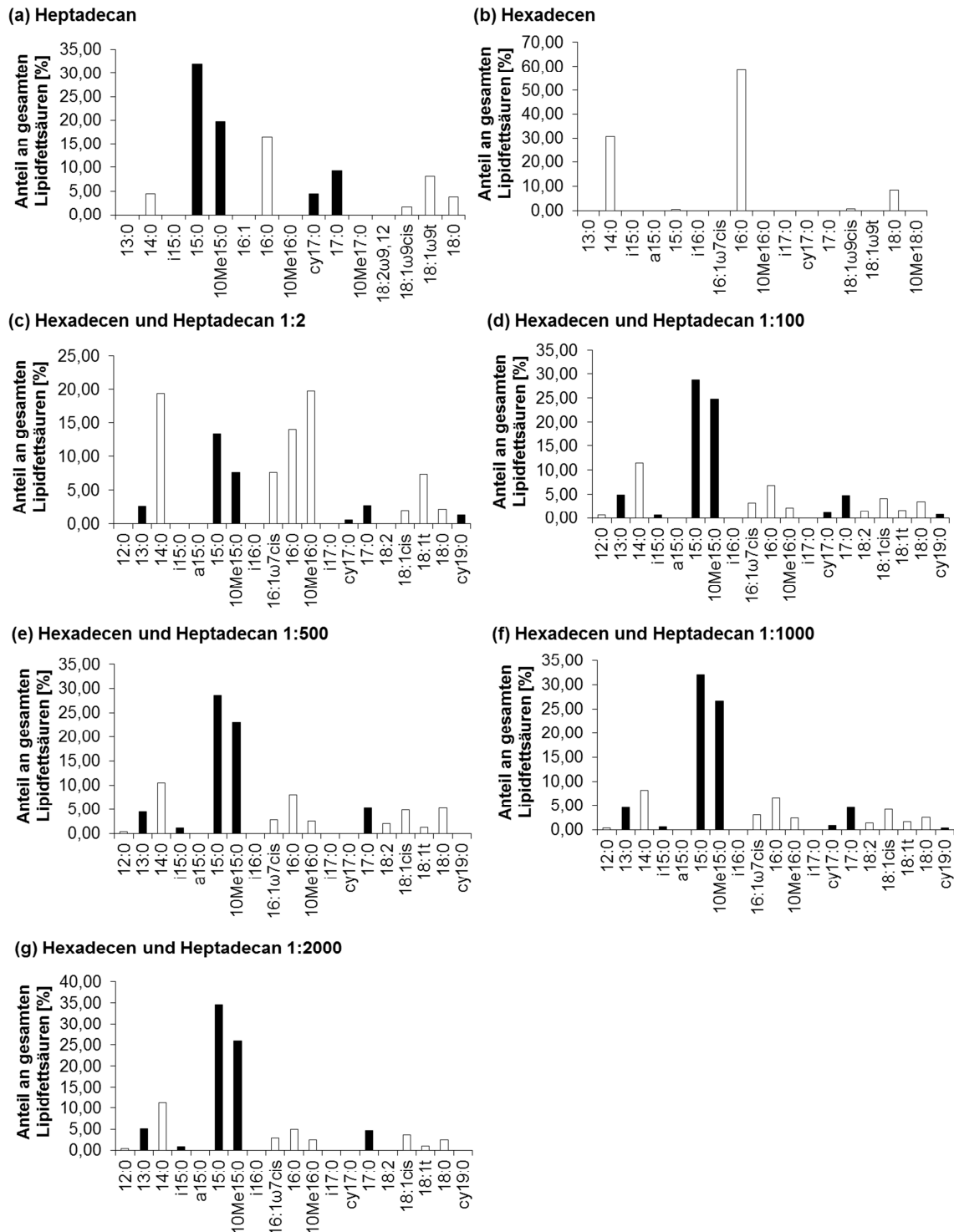


Abb. 34: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in *D. alkenivorans* gewachsen auf Heptadecan, Hexadecen und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen. Fettsäuremuster der Zellen gewachsen auf Heptadecan (a), Hexadecen (b) und auf beiden Substraten in den Mischverhältnissen 1:2 (c), 1:100 (d), 1:500 (e), 1:1000 (f) und 1:2000 (g). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoff-anzahl. i: iso, a: anteiso, t: trans, cy: cyclisch, Me: methyliert, ω7, 9, 12: Doppel-binding in der omega-7, 9, 12 Position

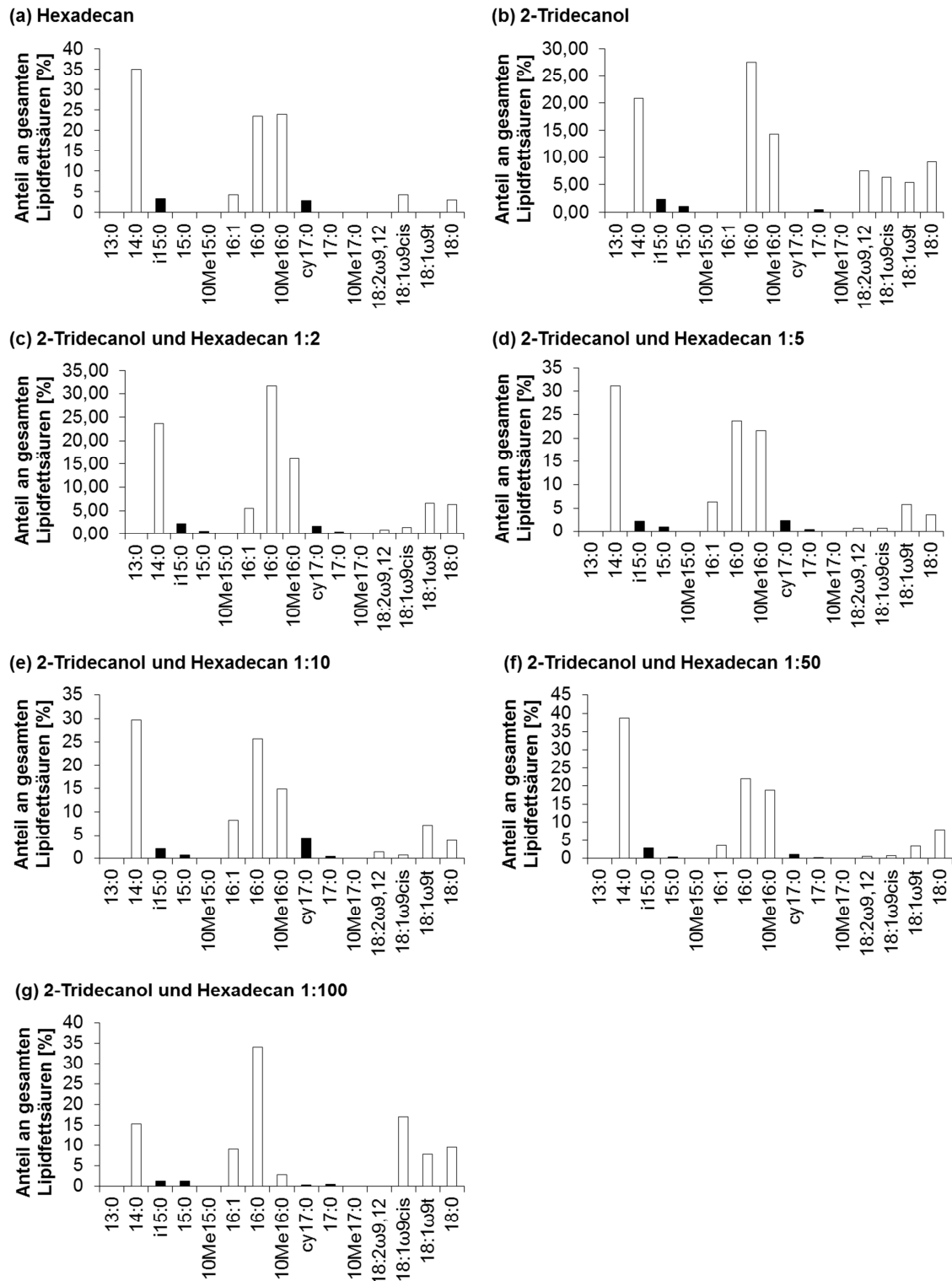


Abb. 35: Relative Häufigkeit der gesamten Lipidfettsäuren in *D. alkenivorans* gewachsen auf Hexadecan, 2-Tridecanol und beiden Substraten zusammen in verschiedenen Mischverhältnissen. Fettsäuremuster der Zellen gewachsen auf Hexadecan (a), 2-Tridecanol (b) oder auf beiden Substraten zusammen in den Mischverhältnissen 1:2 (c), 1:5 (d), 1:10 (e), 1:50 (f) und 1:100 (g). Die weißen Säulen zeigen Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen und die schwarzen Säulen mit einer ungeraden Kohlenstoff-anzahl. i: iso, t: trans, cy: cyclisch, Me: methyliert, ω9: Doppelbindung in der omega-9 Position

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Heider danken, dass er es mir ermöglicht hat, an dem sehr interessanten und vielseitigen Thema des anaeroben Abbaus von Alkanen und Alkenen zu forschen. Vielen Dank für die Unterstützung, die sehr gute Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen!

Weiterhin möchte ich meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel danken, für die hilfreichen Diskussionen und Anmerkungen insbesondere während der Laborm meetings.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei den weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch und Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer.

Für die sehr hilfreiche wissenschaftliche Kooperation möchte ich mich bei Herrn Dr. Kevin Kuntze, Frau Dr. Petra Bombach und Herrn Prof. Dr. Hans H. Richnow des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ in Leipzig, sowie Herrn Dr. Stefan Baumeister aus dem Bereich Proteinanalytik der Philipps-Universität Marburg bedanken.

Ganz großer Dank gebührt auch all meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Heider und Buckel, die immer ein offenes Ohr hatten und mir bei Bedarf mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich werde euch vermissen!

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie, die mich die ganze Zeit über unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Habt vielen Dank dafür!!!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Katharina Sünwoldt
Geburtsdatum	23 September 1986
Geburtsort	Neubrandenburg

Ausbildung und beruflicher Werdegang

04/2012 – 12/2015	Promotion im Fachgebiet mikrobielle Biochemie bei Prof. Dr. J. Heider, Philipps-Universität Marburg. Titel der Dissertation „Anaerober Abbau von Alkanen und Alkenen durch Sulfatreduzierer“.
10/2008 – 09/2011	Hauptstudium der Biologie mit den Schwerpunkten Angewandte Mikrobiologie, Mikrobielle Ökologie und Virologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald. Diplomarbeit bei Prof. Dr. F. Schauer Titel: „Abbau von verzweigt-kettigen Substanzen durch Actinobacteria“
10/2006 – 09/2008	Grundstudium der Biologie und Abschluss des Vordiploms an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald.
06/2006	Abitur , Joliot-Curie-Gymnasium, Röbel/Müritz.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Anaerober Abbau von Alkanen und Alkenen durch Sulfatreduzierer“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 25.08.2016

Katharina Sünwoldt